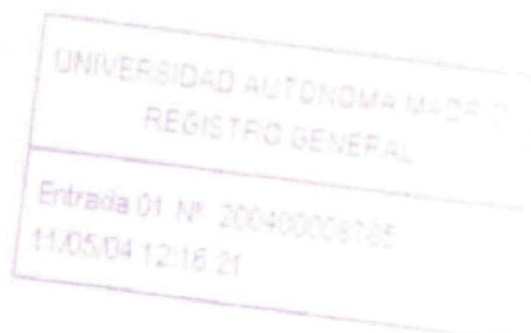


M/ TESIS/ 2562

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Medicina



**APOPTOSIS *IN VITRO* INDUCIDA POR FÁRMACOS EN
PACIENTES CON LLC-B Y SU UTILIDAD COMO FACTOR
PREDICTIVO DE RESPUESTA TERAPÉUTICA**

TESIS DOCTORAL

Res FM: 24057

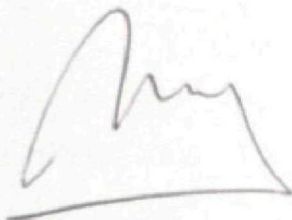
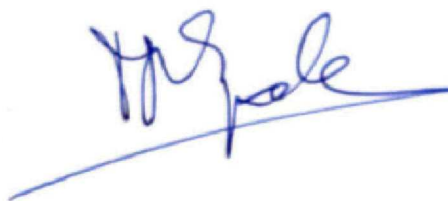


MIGUEL YEBRA BANGO

Madrid, 2004



Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de "Sobresaliente con labor" por unanimidad
Madrid, 1. Julio. 2004

A handwritten signature in blue ink, consisting of a series of loops and a final horizontal stroke.A handwritten signature in blue ink, featuring a large, stylized 'M' followed by several loops and a horizontal base line.A handwritten signature in blue ink, characterized by multiple vertical strokes and a diagonal line crossing through them.A handwritten signature in blue ink, enclosed within a large, oval-shaped loop.A handwritten signature in blue ink, with a stylized 'M' and 'G' followed by a horizontal base line.

MIGUEL YEBRA BANGO

**APOPTOSIS *IN VITRO* INDUCIDA POR FÁRMACOS EN PACIENTES CON
LLC-B Y SU UTILIDAD COMO FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA
TERAPÉUTICA**

DIRECTORES: **Dr. D. JUAN ANTONIO VARGAS NÚÑEZ.** PROFESOR
ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y JEFE ADJUNTO
DEL SERVICIO DE MEDICINA INTERNA DEL HOSPITAL
UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO DE MADRID.

Dra. Dña RAQUEL CASTEJÓN DÍAZ. DOCTORA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS. LABORATORIO DE MEDICINA
INTERNA. HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE
HIERRO DE MADRID.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE MEDICINA

2004



INFORME EMITIDO POR EL DR. JUAN ANTONIO VARGAS NÚÑEZ, PROFESOR ASOCIADO DEL DEPARTAMENTO DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID Y POR LA DRA. RAQUEL CASTEJÓN DÍAZ, LABORATORIO DE MEDICINA INTERNA, HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO DE MADRID, COMO DIRECTORES DEL TRABAJO

"APOPTOSIS *IN VITRO* INDUCIDA POR FÁRMACOS EN PACIENTES CON LLC-B Y SU UTILIDAD COMO FACTOR PREDICTIVO DE RESPUESTA TERAPÉUTICA"

QUE PRESENTA D. MIGUEL YEBRA BANGO COMO TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR,

La leucemia linfática crónica B (LLC-B) es un síndrome linfoproliferativo caracterizado por la expansión de una población clonal de linfocitos B que coexpresan los antígenos CD19 y CD5. Se ha sugerido que el acumulo de la población clonal, es debido a una apoptosis disminuida más que a una elevada proliferación. La LLC-B se caracteriza por la diversidad de hallazgos clínicos y la gran heterogeneidad pronóstica. Así, mientras algunos pacientes permanecen estables y sin necesidad de tratamiento, otros presentan un curso clínico agresivo y fallecen a consecuencia de la enfermedad.

Los avances en el conocimiento de los mecanismos biológicos de la LLC-B han permitido identificar una serie de factores pronóstico que facilitan la detección de los pacientes que van a desarrollar un curso clínico agresivo y que, por ello con más probabilidad, van a requerir tratamiento. Sin embargo, los tratamientos actuales para la LLC-B no ofrecen curación para la mayoría de los pacientes y, en cambio, presentan efectos secundarios adversos. Por estas razones la posibilidad de contar con un ensayo *in vitro* que pudiera predecir la respuesta clínica a un agente concreto sería de enorme valor en la selección de fármacos en pacientes con LLC-B.

En este trabajo se ha determinado la apoptosis *in vitro* espontánea e inducida por fármacos (clorambucil, fludarabina y 2-clorodeoxiadenosina) en linfocitos B de sangre periférica de pacientes con LLC-B. Se ha utilizado una técnica novedosa de citometría de flujo para la detección de las células apoptóticas que permite cuantificarlas de una forma objetiva, sensible y rápida. Los resultados muestran la inducción de apoptosis por los fármacos utilizados, correlacionándose unos índices bajos de apoptosis con factores de mal pronóstico. Finalmente, se ha observado que los análogos de purina, a diferencia del clorambucil, tienen una respuesta *in vitro* que se correlaciona con su respuesta *in vivo*, lo que permite plantear en un futuro la utilización de ensayos predictivos *in vitro* de respuesta terapéutica en pacientes de LLC-B.

Por todo lo expuesto, consideramos que el trabajo presentado por D. Miguel Yebra Bango, realizado bajo nuestra dirección, reúne las condiciones metodológicas, contenido y originalidad adecuadas para ser admitido como Tesis para optar al grado de Doctor por el Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y ser públicamente defendido ante el Tribunal que proceda.

Madrid, a 10 de mayo de 2004.

Fdo: Juan A. Vargas Núñez

Fdo: Raquel Castejón Díaz

A María Jesús, mi mujer.
A mis hijos Miguel, Julia e Irene.

Es abrumador cuánto ignoramos
Aún más cuánto creemos saber
Philip Roth

AGRADECIMIENTOS

La Inmunología Tumoral es, para un viajero, un cosmos diminuto plagado de estrellas parpadeantes, de minúsculos soles y de polvo de planetas. Un lenguaje de humo contiene las claves de su imposible equilibrio. Infinitas señales y códigos deciden el ser o no ser de las estrellas.

A Alberto Durántez, que señaló con el dedo un universo de luces parpadeantes y a Valentín Cuervas que no me dejó pensar en otra cosa.

A Juan Antonio Vargas, que preparó y coordinó mi viaje con sabiduría y generosidad.

A Raquel Castejón y a María Jesús Citores, que me hicieron entender el lenguaje de los astros.

A Raquel, otra vez, que siempre estuvo a mi lado y me regaló un puñado de estrellas fugaces que renegaban de su destino.

A Pablo Tutor, a Susana Mellor y a Yolanda Romero, que pusieron nombre a los planetas para señalar mi ruta.

A mis compañeros de trabajo, que silenciaron los ruidos que hacían peligrar mi aventura.

A mi familia y a mis amigos, que me dieron razones para regresar.

A Clara y a Concha, porque sí.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
1. DEFINICIÓN.....	1
2. EPIDEMIOLOGÍA.....	1
3. CLÍNICA.....	1
4. INMUNOFENOTIPO.....	2
5. CITOGENÉTICA.....	3
6. DIAGNÓSTICO.....	4
7. HISTORIA NATURAL.....	5
8. ESTADIO CLÍNICO Y OTROS FACTORES PRONÓSTICOS.....	5
8.1. Factores Pronósticos Clásicos.....	6
8.2. Factores Pronósticos Recientes.....	9
9. TRATAMIENTO.....	11
9.1. Quimioterapia.....	13
9.2. Anticuerpos Monoclonales.....	17
9.3. Anticuerpos Monoclonales y Quimioterapia.....	17
9.4. Transplante de células hematopoyéticas.....	18
9.5. Otros procedimientos terapéuticos.....	19
9.6. Tratamiento de las complicaciones.....	20
10. APOPTOSIS.....	21
10.1. Apoptosis y cáncer.....	22
10.2. Apoptosis y LLC-B.....	23
OBJETIVOS.....	25
MATERIALES Y METODOS.....	26
1. MATERIALES.....	26
1.1. Aparatos.....	26
1.2. Reactivos.....	26
1.3. Pacientes.....	28
1.4. Obtención de las muestras.....	29
2. MÉTODOS.....	37
2.1. Aislamiento de células mononucleadas y purificación de linfocitos B.....	37

2.2. Marcaje de antígenos de la superficie celular por inmunofluorescencia.....	37
2.3. Inducción de apoptosis <i>in vitro</i> por agentes quimioterápicos.....	38
2.4. Determinación y cuantificación de la apoptosis.....	39
2.5. Adquisición de muestras y análisis de los resultados.....	42
2.6. Análisis estadístico.....	42

RESULTADOS.....43

1. TRATAMIENTO Y RESPUESTA CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON LLC-B.....	43
2. APOPTOSIS ESPONTÁNEA INDUCIDA POR FÁRMACOS (CLORAMBUCIL, FLUDARABINA Y 2-CLORODEOXIADENOSINA) EN LINFOCITOS B DE SANGRE PERIFÉRICA DE LOS PACIENTES CON LLC-B.....	48
2.1. Valores de apoptosis <i>ex vivo</i>	51
2.2. Apoptosis espontánea <i>in vitro</i>	51
2.3. Inducción de apoptosis por fármacos.....	51
2.4. Índices de apoptosis inducida por clorambucil a las 24 y 48 horas.....	55
2.5. Índices de apoptosis inducida por análogos de purina a las 24 y 48 horas.....	55
2.6. Comparación de los índices de apoptosis inducida por clorambucil con los de fludarabina a las 24 y 48 horas.....	55
2.7. Influencia del tratamiento previo y/o durante la realización del ensayo <i>in vitro</i>	55
3. CORRELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y LA APOPTOSIS INDUCIDA POR FÁRMACOS EN LOS PACIENTES CON LLC-B.....	58
3.1. Edad y sexo de los pacientes.....	58
3.2. Estadios clínicos de Rai y de Binet.....	58
3.3. Número absoluto de linfocitos en sangre periférica.....	59
3.4. Tiempo de duplicación linfocitaria (TDL).....	59
3.5. Morfología de los linfocitos en sangre periférica.....	59
3.6. Patrón morfológico de la médula ósea.....	60

3.7. Niveles de $\beta 2$ microglobulina.....	60
3.8. Niveles de láctico dehidrogenasa sérica (LDH).....	60
3.9. Niveles de inmunoglobulinas séricas.....	60
3.10. Expresión del antígeno CD38 en los linfocitos de sangre periférica.....	60
3.11. Expresión de la proteína ZAP-70	61
3.12. Alteraciones cromosómicas	61
4. CORRELACIÓN ENTRE LA RESPUESTA CLÍNICA AL TRATAMIENTO Y LA APOPTOSIS <i>IN VITRO</i> INDUCIDA POR FÁRMACOS EN LOS PACIENTES CON LLC-B	63
4.1. Correlación de la respuesta clínica a los agentes del GA con los índices de apoptosis <i>in vitro</i> con clorambucil a 24 y 48 horas.....	66
4.2. Correlación de la respuesta clínica a agentes del GP con los índices de apoptosis <i>in vitro</i> con fludarabina a 24 y 48 horas.....	67
4.3. Influencia del tratamiento previo o concomitante en la correlación <i>in vivo/in vitro</i>	68
DISCUSIÓN.....	69
CONCLUSIONES.....	83
BIBLIOGRAFÍA.....	84

INTRODUCCIÓN

1. DEFINICIÓN

La leucemia linfóide crónica de células B (LLC-B) es una enfermedad linfoproliferativa crónica caracterizada por la acumulación progresiva de linfocitos B monoclonales de aspecto maduro, funcionalmente incompetentes (Kipps TJ, 2002; Rai KR, 2000a). Representa más del 95% de las LLC. De acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) se considera una enfermedad idéntica, aunque en diferente estadio, al linfoma linfocítico difuso de células B pequeñas (Harris NL, 1999).

2. EPIDEMIOLOGÍA

Es la leucemia más común en los adultos del mundo occidental, más frecuente en varones de raza blanca (Hernández JA, 1995). Afecta sobre todo a personas de edad avanzada con una mediana de edad al diagnóstico de 70 años pero no es excepcional detectar la enfermedad entre los 30 y los 40 años (Hernández JA, 1995; Montserrat E, 1991). La etiología se desconoce. Se ha intentado relacionar con factores ambientales o hereditarios sin que existan pruebas definitivas (Preston DL, 1994; Yuille MR, 2000).

3. CLÍNICA

La presentación clínica es variable, desde el paciente asintomático cuyo diagnóstico se sospecha al realizar analíticas rutinarias (25%), hasta el que presenta síntomas tipo B (astenia intensa, pérdida de peso, sudoración nocturna y fiebre) (5-10%), siendo la consulta más común la aparición de adenopatías (Kipps TJ, 2002; Rai KR, 2000). Ocasionalmente la presentación clínica tiene relación con la deficiencia inmunológica en forma de infecciones, con fenómenos autoinmunes como anemia hemolítica o trombopenia inmune o raramente con reacciones exageradas a la picadura de insectos (Weed RI, 1965).

En la exploración física el hallazgo más común es la presencia de adenopatías en número, características, tamaño y localización variable, seguidos de esplenomegalia y hepatomegalia. También es posible la afectación de órganos linfoides extraganglionares

como el anillo de Waldeyer y más excepcionalmente de otros órganos como la piel (Kipps TJ, 2002; Rai KR, 2000). La radiografía de tórax y la tomografía computerizada (TC) pueden poner de manifiesto la afectación del mediastino, retroperitoneo o mesenterio (Kipps TJ, 2002).

La alteración de laboratorio más habitual es la linfocitosis, generalmente $>10.000/\mu\text{l}$ y frecuentemente $>100.000/\mu\text{l}$ de células de aspecto maduro que representan el 50-100% de los leucocitos y que a veces adquieren aspecto deformado al extender la muestra de sangre sobre el porta (Smudge cells). Una minoría pueden ser prolinfocitos. Otras anomalías frecuentes son anemia y trombopenia. La biopsia de médula ósea, aunque no es imprescindible para el diagnóstico, demuestra un porcentaje de linfocitos $> 30\%$ de las células nucleadas (Kipps TJ, 2002; Rai KR, 2000). En la biopsia ganglionar, si se realiza, se reconocerá el patrón de linfoma linfocítico difuso de células pequeñas (Harris NL, 1999). Otras anomalías de laboratorio son de naturaleza autoinmune como la anemia hemolítica Coombs directo positivo, la trombopenia autoinmune, agranulocitosis, aplasia pura de la serie roja (Diehl LF, 1998). Es frecuente a lo largo de la enfermedad la aparición de hipogammaglobulinemia y la respuesta defectuosa frente a infecciones y vacunaciones, que incrementan la vulnerabilidad de estos pacientes a infecciones bacterianas por organismos encapsulados y bacterias gramnegativas (Morrison VA, 1998). Raramente se observa un pico monoclonal, usualmente IgM y es frecuente, pero inespecífica, la presencia de niveles elevados de láctico dehidrogenasa sérica (LDH) y de beta-2 microglobulina.

4. INMUNOFENOTIPO

Los linfocitos de la LLC-B morfológicamente se parecen a linfocitos maduros de individuos sanos. Sin embargo, los linfocitos de la LLC-B son clonales y representan células B detenidas en el proceso de diferenciación en algún estadio intermedio entre células pre-B y células B maduras que han sufrido activación por el contacto con el antígeno (Damle RN, 2002).

Las tres características fenotípicas de la LLC-B (Freedman AS, 1990; Kurec AS, 1992) son:

- a. Niveles extremadamente bajos de inmunoglobulinas de superficie (IgM o IgM e IgD) con presencia de cadena ligera kappa o lambda pero no los dos.
- b. Expresión de uno o más antígenos asociados a células B: CD19, CD20 (leve), CD21, CD23, CD24.
- c. Expresión de CD5, un antígeno habitualmente asociado a células T.

Las células forman rosetas con hematíes de ratón y expresan HLA-DR. Es variable la expresión de receptores para el fragmento Fc de las inmunoglobulinas, receptores de interleucina 2 (p55, p75), IL-3, G-CSF, CM-CSF, factor de necrosis tumoral (TNF), integrina CD11 y moléculas de adhesión CD54, CD58 y L Selectina (Trentin L, 1994; Hanson CA, 1990; De Rossi G, 1993).

Se ha descrito un grupo de pacientes con LLC-B que no expresan CD5, pero su relación con la forma clásica es incierta (Huang JC, 1999). Por otra parte, un pequeño porcentaje de células B maduras en sangre periférica de los individuos normales expresan CD5 y tienen muchas o todas las características de las células de la LLC-B incluida la monoclonalidad (Rawstron AC, 2002); pueden también estar presentes en la zona del manto de los ganglios y en el bazo fetal. Los linfocitos B CD5+ se encuentran aumentados en algunas enfermedades autoinmunes (Plater-Zyberk C, 1985).

5. CITOGENÉTICA

La mayoría de las células leucémicas en la LLC-B se encuentran en fase G₀ y por tanto con un número de metafases pequeño, por lo que las técnicas convencionales citogenéticas (G-banding) son poco rentables. Ha sido necesario utilizar mitógenos que estimulen los linfocitos en cultivo para conseguir realizar el cariotipo. Con ello el 40-70% de las LLC-B tienen anomalías cromosómicas siendo las más frecuentes la trisomía 12, 14q+ y t(11;14) (Juliussón G, 1993). Cuando se utilizan técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH), el porcentaje de anomalías cromosómicas supera el 80% siendo las más frecuentes en orden descendente del 13q-, del 11q-, trisomía 12, del 17p- (Dohner H, 2000). Las alteraciones genéticas están restringidas a

las células B y pueden adquirirse con el tiempo en más de un tercio de los casos, detectándose el cambio más frecuente en la delección 11q- (Fegan C, 1995).

6. DIAGNÓSTICO

Los requerimientos establecidos por The National Cancer Institute Sponsored Working Group (NCI-WG) (Cheson BD, 1988; Cheson BD, 1996) para realizar el diagnóstico son:

- a. Una linfocitosis absoluta en sangre periférica $\geq 5.000/\mu\text{l}$ con una población predominante de linfocitos pequeños, maduros en apariencia, mantenida al menos cuatro semanas.
- b. Una biopsia de médula ósea normo o hiper celular que muestra al menos 30% de linfocitos sobre el total de células nucleadas.
- c. Un fenotipo monoclonal de células B expresado en la población linfocitaria: bajos niveles de inmunoglobulinas de superficie, cadena ligera κ ó λ , expresión del antígeno CD5 y positividad para uno o más antígenos asociados a célula B (CD19, CD20 [leve], CD21, CD23, CD24).

La afectación de la médula ósea excluye la necesidad de repetir a las cuatro semanas el recuento de sangre periférica ya que la médula ósea no sufre alteraciones en los procesos reactivos infecciosos.

Otro grupo de trabajo, The International Workshop on CLL (IWCLL, 1989), propone los mismos criterios pero exige una cifra de linfocitosis absoluta $\geq 10.000/\mu\text{l}$ si no puede realizarse estudio fenotípico. Por último, The FAB Cooperative Group (Bennet JM, 1989) establece el término LLC tipo mixto cuando $>10\%$ de células en sangre son grandes (o prolinfocitos), pero el interés de este subgrupo no es compartido por todos los autores (Rai KR, 2000).

Debe realizarse el diagnóstico diferencial con procesos infecciosos (linfocitosis reactiva) y con varias enfermedades malignas linfoproliferativas (Rai KR, 2000; Kipps TJ, 2002) como son: linfoma linfocítico de células pequeñas, linfoma linfoplasmocítico, linfoma del manto, linfoma esplénico de la zona marginal, leucemia de células peludas,

leucemia de linfocitos granulares grandes, micosis fungoide, linfoma/leucemia de células T del adulto, leucemia prolinfocítica y LLC de células T.

7. HISTORIA NATURAL

Existe una creencia muy extendida de que la LLC es una enfermedad indolente con un curso de 10-20 años y que la muerte del paciente no suele guardar relación con la enfermedad neoplásica, pero ello ocurre en menos de un tercio de los casos. Algunos pacientes tienen un curso agresivo y mueren rápidamente en 2-3 años desde el diagnóstico y la mayoría lo hacen en 5-10 años con un inicio indolente y una fase terminal de 1-2 años donde predominan las complicaciones de la enfermedad o del tratamiento. Las causas más frecuentes de muerte son infecciones, hemorragia y caquexia (Kipps TJ, 2002; Rai KR, 2000). Tampoco es infrecuente la transformación maligna como acontecimiento terminal, no siempre clonalmente relacionada. Los tumores de aparición más frecuente son la leucemia prolinfocítica (la más común), el linfoma difuso de células grandes B (Síndrome de Richter), la enfermedad de Hodgkin, el mieloma múltiple, la leucemia aguda mieloblástica, el síndrome mielodisplásico y los segundos tumores sólidos. Es excepcional la transformación en leucemia aguda linfoblástica (Kjeldsberg CR, 1981; Giles FJ, 1998; Travis LB, 1992; Hisada M, 2001; Kipps TJ, 2002; Rai KR, 2000).

8. ESTADIO CLÍNICO Y OTROS FACTORES PRONÓSTICOS

La historia natural de la LLC es extremadamente variable con supervivencias, desde el diagnóstico, que oscilan entre 2 y 20 años. Según esto, se ha considerado la enfermedad como "agresiva" o "indolente", por lo que es importante encontrar factores pronósticos que puedan predecir la evolución, permitan clasificar a los pacientes por grupos pronósticos y, a la vista de los tratamientos actuales más eficaces, poder seleccionar los pacientes que deben ser tratados y el momento más adecuado (Shanafelt TD, 2004).

8.1. Factores pronósticos clásicos

- **Estadio clínico.**

La mayoría de las clasificaciones por grupos pronósticos se han basado en el concepto de que la acumulación de células tumorales en la LLC es gradual y progresiva, que comienza en la médula ósea y sangre y progresivamente afecta a los ganglios, hígado y bazo para terminar comprometiendo la función de la médula ósea. Los sistemas de clasificación más relevantes son:

- a. La clasificación de Rai, más utilizada en Estados Unidos, tiene en cuenta la presencia de adenopatías, visceromegalias y si existe o no anemia o trombopenia (Rai KR, 1975). Esta clasificación (Tabla 1) tiene en cuenta una cifra de linfocitos $>15.000/\mu\text{l}$ y un porcentaje de linfocitos medulares $>40\%$ aunque siguiendo las recomendaciones de la NCI-WG (Cheson BD, 1988; Cheson BD, 1996) y de la IWCLL (IWCLL, 1989), los mismos autores recomiendan que estos niveles sean modificados a $\geq 5.000/\mu\text{l}$ y $>30\%$ en sangre y médula ósea respectivamente (Rai KR, 2000). La mediana de la supervivencia correlaciona inversamente con el estadio clínico (Tabla 1). Teniendo en cuenta que cinco estadios parecen engorrosos para planear ensayos terapéuticos, los autores hicieron una modificación de su clasificación original más simple y de igual interés pronóstico: riesgo bajo (estadio 0), riesgo intermedio (estadios I-II) y riesgo alto (estadios III-IV) (Rai KR, 1987).
- b. Clasificación de Binet, más utilizada en Europa, distingue 3 estadios según el número de territorios linfoides afectados (ganglios cervicales, axilares e inguino-femorales, e hígado y bazo) y la presencia o ausencia de anemia y trombopenia (Binet JL, 1981). La mediana de supervivencia correlaciona igualmente con el estadio clínico (Tabla 2). Ambos sistemas son semejantes pero en la clasificación de Rai hay menos pacientes que se consideren en la categoría de bajo riesgo.

Tabla 1. Clasificación de Rai

ESTADIO	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	SUPERVIVENCIA (Mediana)
0	Solamente linfocitosis, en sangre ($>15.000/\mu\text{l}$) y médula ósea ($>40\%$ de linfocitos)*	> 12 años
I	Linfocitosis y linfadenopatías	8,5 años
II	Linfocitosis y hepatomegalia y/o esplenomegalia Los ganglios pueden estar o no aumentados de tamaño	6 años
III	Linfocitosis y anemia (hemoglobina $<11\text{ g/dl}$ ó hematocrito $<33\%$) Los ganglios, bazo e hígado pueden estar o no aumentados de tamaño	1,5 años
IV	Linfocitosis y trombocitopenia (plaquetas $<100.000/\mu\text{l}$) Puede haber o no anemia y aumento de tamaño de los órganos	1,5 años

* En la actualidad se acepta como estadio 0, linfocitosis en sangre periférica $>5-10.000/\mu\text{l}$
y linfocitosis medular $>30\%$

Tabla 2. Clasificación de Binet

ESTADIO	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS		SUPERVIVENCIA (Mediana)
A	Hemoglobina $\geq 10\text{ g/dl}$ y	< 3 áreas ganglionares aumentadas de tamaño*	**
B	Plaquetas $\geq 100.000/\mu\text{l}$	≥ 3 áreas ganglionares aumentadas de tamaño	7 años
C	Hemoglobina $< 10\text{ g/dl}$ Plaquetas $< 100.000/\mu\text{l}$	Cualquier número de áreas ganglionares aumentadas de tamaño	2 años

* Se explorará cada una de las áreas ganglionares siguientes (unilateral o bilateralmente):
cervical, axilar, inguinal; bazo e hígado cuentan como un área

**Supervivencia equivalente a la de la población normal para la edad y el sexo

- c. Otros sistemas de clasificación son más complejos y de difícil aplicación. Quizá hay que destacar la recomendación del IWCLL de integrar en un mismo esquema la clasificación de Rai y la de Binet (ej: A0, A1, AII, B1, BII, CIII, CIV) (IWCLL, 1989).

Con el transcurso del tiempo los pacientes tienden a progresar de estadios tempranos a intermedios o avanzados, sin embargo, si se alcanza remisión completa o parcial con el tratamiento y el paciente pasa de una categoría alta a otra más favorable, el pronóstico mejora y se ajusta a la categoría última alcanzada.

- **Otros factores pronósticos clásicos**

Los sistemas de clasificación de Rai y Binet son útiles pero limitados. Son capaces de identificar los estadios III y IV de Rai y C de Binet que siempre tienen mal pronóstico, pero no de diferenciar qué pacientes van a evolucionar de forma agresiva en los grupos de riesgo bajo e intermedio (estadios 0, I, II de Rai y A y B de Binet). En este sentido, el Grupo Cooperativo Francés de LLC concluye que los pacientes en estadio A de Binet que tienen una hemoglobina $>12\text{g/dl}$ y una cifra de linfocitos periféricos $<30.000/\mu\text{l}$ tienen una supervivencia igual a la población general francesa de igual edad y sexo (FCG-CLL, 1990a) aunque ello haya sido puesto en duda por otros autores (Rai KR, 2000).

Tiempo de duplicación de linfocitos (TDL): los pacientes que duplican la cifra de linfocitos en un tiempo >12 meses tienen mejor pronóstico que los que lo hacen en <12 meses (Montserrat E, 1986; Molica S, 1987). Este análisis es retrospectivo y su consideración puede retrasar el tratamiento en algunos pacientes con enfermedad agresiva.

Patrón histológico de la médula ósea: el patrón de afectación difuso tiene peor pronóstico que el resto de patrones nodular, intersticial y mixto (Rozman C, 1981; Rozman C, 1984).

Los trabajos del Grupo de Barcelona concluyen que en los pacientes en estadio A de Binet, una cifra de linfocitos en sangre $<30.000/\mu\text{l}$, un tiempo de duplicación linfocitaria de >12 meses, una hemoglobina $\geq 13\text{g/dl}$ y una biopsia de médula ósea mostrando un patrón de afectación no difusa (LLC

“smoldering”), está asociado con una supervivencia similar a la población general española de igual sexo y edad (Montserrat E, 1993).

β -2 microglobulina: los niveles séricos correlacionan con el estadio clínico (Spati B, 1980). Aunque estudios retrospectivos encuentran un valor predictivo en análisis multivariable, otros prospectivos no confirman dicho valor como variable independiente del estadio clínico (Giles FJ, 2003; Molica S, 1999).

Otros factores como la edad y sexo (Diehl LF, 1999; Mauro FR, 1999), el número absoluto de linfocitos (Rozman C, 1982), la morfología y tamaño de los linfocitos (Vallespi T, 1991), los niveles de láctico dehidrogenasa sérica (Han T, 1985) y otros, no está claro que tengan un significado pronóstico definido.

8.2. Factores Pronósticos Recientes

- **Análisis cromosómicos**

Los pacientes con cariotipo normal o anomalías 13q- tienen mejor supervivencia que los pacientes con trisomía 12 o cariotipo complejo (Juliussen G, 1990) después de controlar la edad y el estadio. En un estudio reciente con técnicas de FISH se encontró por análisis multivariable que los pacientes que tenían del 17p- y del 11q- tuvieron una supervivencia más corta que los pacientes con del 13q-, trisomía 12 o cariotipo normal (Dohner H, 2000). Estos resultados contrastan con los de otros autores (García Marco JA, 1996).

El gen p53 está localizado en el brazo corto del cromosoma 17 y es inductor de apoptosis. Su disregulación puede ser debida a anomalías en el cromosoma 17 y 11 y predice la respuesta a análogos de purina. Su disfunción está presente en el 26% de los pacientes y es más frecuente que las anomalías del cromosoma 17 y 11 (Dohner H, 2000). Ya que la adquisición de nuevas anomalías cromosómicas puede producirse durante el curso de la enfermedad (evolución clonal), y modificar la agresividad de la enfermedad, puede estar indicado el uso de técnicas de interfase FISH al diagnóstico y durante la evolución (Shanafelt TD, 2004).

- ***Estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulinas (Vh)***

Aunque históricamente se había pensado que las células de la LLC-B representaban la transformación de linfocitos B naïve del centro germinal que no sufrían exposición antigénica, varios estudios han encontrado que la mitad de los pacientes exhiben mutación somática de las cadenas de inmunoglobulinas que sugiere su origen en las células B de memoria del centro germinal. En 1999 dos publicaciones simultáneas comunicaron el significado pronóstico del estado mutacional de IgVh, separando así dos tipos de LLC (Damle RN, 1999; Hamblin TJ, 1999):

- a. La que se desarrolla en las células B naïve del centro germinal con genes IgVh no mutados (30-40%) y que se acompaña de anomalías cromosómicas desfavorables, alta expresión del CD38, estadio clínico avanzado, menor respuesta al tratamiento y menor supervivencia.
- b. La que se desarrolla en las células B de memoria del centro post-germinal con genes IgVh mutados (60-70%) y que se acompaña de anomalías cromosómicas más favorables, expresión más baja de CD38, estadio clínico más precoz y excelente supervivencia. La presencia de genes IgVh no mutados se asoció en una serie a una desventaja en la mediana de supervivencia de 18 años cuando se comparaba con la de los pacientes con genes IgVh mutados en estadio A de Binet (8 vs 25 años) (Hamblin TJ, 1999) y en otra a un riesgo de muerte cinco veces mayor (Krober A, 2002). Además los pacientes con genes IgVh no mutados tienen un riesgo más elevado de recaída post-transplante de células madre (Ritgen M, 2003). La dificultad técnica y el alto coste de esta prueba hace necesario encontrar substitutos más rápidos y baratos:

- Expresión CD38: aunque estudios iniciales sugerían una relación entre la presencia de genes no mutados IgVh y una expresión más alta de CD38 con un valor pronóstico semejante en cuanto a la mediana de supervivencia (Hamblin TJ, 1999), estudios posteriores no han confirmado el poder predictivo del CD38 como indicador del estado

de curar la enfermedad. Es dudoso que los nuevos tratamientos con análogos de purina y el trasplante de médula ósea, capaces de conseguir mayores tasas de remisión completa, sean también capaces de alcanzar una supervivencia más prolongada, una menor tasa de recidivas o un mayor porcentaje de curación. Por tanto, los pacientes con LLC "smoldering" no deben ser tratados (Montserrat E, 1993; French Cooperative Group of LLC, 1990a) y sólo sometidos a observación periódica estrecha. Unicamente estará indicado el tratamiento en pacientes que presentan determinadas características (Cheson BD, 1996; IWCLL, 1989):

1. Anemia y/o trombopenia no autoinmunes (Estadios III y IV de Rai o C de Binet).
2. Síntomas relacionados con la enfermedad: astenia intensa, pérdida de peso, fiebre, sudoración nocturna o adenopatías dolorosas.
3. Enfermedad progresiva: tiempo de duplicación de linfocitos <6 meses y/o adenopatías o visceromegalias de rápido crecimiento.
4. Es más dudosa la indicación de tratamiento en anemia y/o trombopenia autoinmune con pobre respuesta al tratamiento esteroideo o infecciones repetidas por hipogammaglobulinemia grave.

El Instituto Nacional de Cáncer en Estados Unidos (Cheson BD, 1996) y el Workshop International en Leucemia Linfocítica Crónica (1989), han definido criterios de respuesta al tratamiento:

1. Remisión Completa: todos los siguientes criterios presentes al menos durante 2 meses:
 - a. Ausencia de síntomas atribuibles a la LLC
 - b. Ausencia de adenopatías y visceromegalias.
 - c. Cifra de linfocitos <4.000/ μ l
 - d. Cifra de neutrófilos >1.500/ μ l
 - e. Cifra de plaquetas >100.000/ μ l
 - f. Cifra de hemoglobina >11 g/dl (no transfundido)

- g. Linfocitos en médula ósea <30% con ausencia de nódulos linfoides

2. Respuesta Parcial: los dos criterios siguientes al menos durante 2 meses:

- a. Una reducción de adenopatías o hepatomegalia de al menos 50%.
- b. Cifra de neutrófilos $>1.500/\mu\text{l}$ o de plaquetas $>100.000/\mu\text{l}$ o de hemoglobina $>11\text{g/dl}$ o mejoría de estos parámetros del 50%, sin ayuda de transfusiones, con respecto a los valores pretratamiento.

La presencia de agregados linfoides en la biopsia de médula ósea, cuando ésta se realiza, categoriza la respuesta del paciente como remisión parcial nodular (Robertson LE, 1992).

3. Enfermedad Progresiva: definida por la presencia de uno o más de los siguientes criterios:

- a. Aparición o incremento de al menos el 50% del tamaño de los ganglios o vísceras.
- b. Aumento de al menos el 50% de la cifra de linfocitos en sangre periférica.
- c. Transformación tipo Richter o leucemia prolinfocítica.

4. Enfermedad Estable se define como la que alcanzan los pacientes que no tienen remisión completa o parcial ni progresión de la enfermedad.

El "International Workshop" en Leucemia Linfóide Crónica (1989) establece los mismos criterios para definir Remisión Completa y define Respuesta Parcial, Enfermedad Progresiva o Enfermedad Estable, como el cambio en un sentido u otro o la persistencia en los estadios de Binet.

9.1. Quimioterapia

- **Agentes alquilantes y/o corticosteroides**

El tratamiento clásico de la LLC ha consistido en la utilización de clorambucil o ciclofosfamida con o sin corticosteroides. La eficacia de ambos agentes alquilantes se considera similar (Huguley CMJ, 1977), aunque la ciclofosfamida es más apropiada en los pacientes que presentan trombocitopenia

importante. Su administración debe mantenerse, solamente, hasta conseguir una máxima respuesta clínica estable y la recurrencia de la enfermedad puede ser subsidiaria de nuevo tratamiento. Su administración puede ser diaria o intermitente y los efectos secundarios son bien conocidos (Rai KR, 2000; Kipps TJ, 2002). Es difícil que la falta de respuesta a un agente alquilante pueda subsanarse con la utilización de otro agente del mismo grupo (Rai KR, 2000). Debe recordarse que son fármacos paliativos en estadios avanzados y que no aumentan la supervivencia cuando se han utilizados en pacientes asintomáticos en estadios precoces (Shustik C, 1998; Dighiero G, 1998) aunque el número global de respuestas pueda estimarse en un 80% (RC 15%, RP 65%) (Han T, 1973; Sawitsky A, 1977; Keller JW, 1986).

Los trabajos que han comparado clorambucil o prednisona con la combinación de ambos fármacos, demuestran que la combinación consigue mejores respuestas que los fármacos por separado, pero no impacta en la supervivencia (Han T, 1973; Sawitsky A, 1977). No obstante, en un estudio en que el clorambucil como fármaco aislado en dosis altas se comparó con clorambucil (en pauta intermitente y dosis "convencional") y prednisona, las ventajas se observaron en el grupo de pacientes que recibieron el fármaco aislado (Jaksic B, 1988). La utilización aislada de corticosteroides en dosis elevadas puede conseguir respuestas parciales temporales en pacientes refractarios a otros tratamientos (Thornton PD, 1999). Es reseñable un incremento paradójico y transitorio inicial del número de linfocitos.

Otros regímenes de poliquimioterapia que contienen ciclofosfamida y prednisona con fármacos de otros grupos, vincristina o adriamicina, también han sido efectivos (Liepman M, 1978; Keating MJ, 1990). Los ensayos terapéuticos que comparan clorambucil y prednisona con ciclofosfamida, vincristina y prednisona (CVP) no han demostrado diferencias en las respuestas o en la supervivencia (FCGCLL, 1990b; Raphael B, 1991). Tampoco los estudios que comparan ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona (CHOP) con clorambucil y prednisona han supuesto un avance importante ya que o bien sólo han demostrado beneficios en el porcentaje de respuestas (Hansen MM, 1991; Kimby E, 1991) o incluso la respuesta y supervivencia han sido peor en el grupo que recibía poliquimioterapia (Jaksic B, 1997). Un estudio que comparó CHOP con CVP refiere ventajas en la supervivencia en los pacientes tratados con

CHOP pero su validez es dudosa dada la baja supervivencia que se obtuvo en el grupo que recibió CVP comparada con otras series (FCGCLL, 1989). Otras formas de poliquimioterapia semejantes no han aportado ventajas evidentes (Keating MJ, 1988; Kempin S, 1982).

- **Análogos de purina**

Es un grupo de fármacos que han demostrado actividad en los tumores linfoides de crecimiento lento. El más estudiado ha sido la fludarabina pero también se han publicado experiencias con cladribina (2-clorodeoxiadenosina, 2-CdA) y pentostatina (2-deoxicoformicina, DCF).

- a. Fludarabina**

En los pacientes tratados previamente con agentes alquilantes la utilización de fludarabina consigue una respuesta global superior al 50% (Keating MJ, 1989). En este mismo grupo de pacientes, la fludarabina asociada a esteroides tiene respuestas similares con mayor número de infecciones (O'Brien S, 1993). En los pacientes no tratados previamente, la fludarabina ha conseguido un alto número de respuestas globales (superior a 2/3) y completas (superior a 1/3) (Keating MJ, 1993; Keating MJ, 1998). En una reciente publicación (Rai KR, 2000) se compara fludarabina, clorambucil y ambos, en 544 pacientes, obteniéndose respuestas completas en 20%, 4% y 20% respectivamente y respuestas globales en 63%, 37% y 61% con una mediana de duración de la respuesta mayor en el grupo de fludarabina que en el de clorambucil, pero supervivencias semejantes de 66, 56 y 55 meses respectivamente. Este trabajo y otros previos indican que aunque las respuestas a fludarabina son superiores a las conseguidas con agentes alquilantes, los pacientes recaen en 2-3 años y así no están claras las ventajas en la supervivencia (Keating MJ, 1993; Keating MJ, 1998; Rai KR, 2000). En el último estudio comparativo referido, la toxicidad hematológica fue mayor en el grupo de combinación seguida del grupo que recibió fludarabina, siendo mejor tolerados los agentes alquilantes como fármaco único (Morrison VA, 2001). Además, la combinación de agentes alquilantes y análogos de purina derivó en una mayor tasa de leucemia mieloide y síndrome mielodisplásico (Morrison VA, 2002).

La mayor morbilidad asociada a fludarabina es la inmunosupresión ya que se produce una disminución a menudo persistente de células T CD4+ que posibilita las infecciones oportunistas. También es de destacar una mayor incidencia de fenómenos autoinmunes (Myint H, 1995) y la posibilidad de síndrome de lisis tumoral (Cheson BD, 1998) y de injerto contra huésped post-transfusional (Briz M, 1995), pero no de segundas neoplasias (Cheson BD 1999). Los trabajos comparativos entre fludarabina y combinaciones de poliquimioterapia arrojan cifras semejantes en respuesta y supervivencia (Johnson S, 1996; Leporrier M, 2001).

b. 2-Clorodeoxiadenosina (Cladribina)

Es un análogo de purina que ha demostrado resultados semejantes a fludarabina alcanzando respuestas globales importantes en pacientes tratados previamente con alquilantes (Saven A, 1991; Karlsson K, 2002) y mejores respuestas globales y completas en los pacientes no tratados previamente (Saven A 1995, Karlsson K, 2002), pero no parece ser útil en los pacientes refractarios a fludarabina (O'Brien S, 1994). En un estudio multicéntrico comparativo entre cladribina y prednisona frente a clorambucil y prednisona se observó mayor porcentaje de respuestas y toxicidad en el grupo que recibió análogos de purina pero con una supervivencia semejante (Robak T, 2000).

c. Pentostatina

Del grupo de los análogos de purina es el menos experimentado aunque parece menos eficaz (Ho AD, 1990).

- ***Combinación de análogos de purina y agentes alquilantes***

La combinación de fludarabina y clorambucil frente a fludarabina aislada presenta respuestas semejantes, pero con mayor toxicidad (Rai KR, 2000). La combinación de fludarabina con ciclofosfamida o con ciclofosfamida y mitoxantrona, parece obtener un mayor porcentaje de respuestas globales y completas (incluso moleculares), aunque con mayor incidencia de efectos secundarios hematológicos (O'Brien S, 2001a; Bosch F, 2002).

La asociación de cladribina, ciclofosfamida y prednisona también ha conseguido un porcentaje importante de respuestas globales (Laurencet FM, 1999).

9.2. Anticuerpos Monoclonales

Se dirigen frente a antígenos diana de la superficie de las células neoplásicas. Los más experimentados y de momento más útiles son anti CD20 y anti CD52.

- ***Anti CD20 (Rituximab)***

De utilidad bien demostrada en los linfomas foliculares y menos útil en la LLC-B debido a la baja expresión del antígeno CD20 en esta enfermedad. Como tratamiento aislado consigue sólo respuestas parciales pero la combinación con quimioterapia ha aumentado su eficacia. Como tratamiento inicial o de rescate se han publicado respuestas parciales en 2/3 y 1/3 de los pacientes respectivamente (Hainsworth JD, 2003; O'Brien S, 2001b). Es destacable la posibilidad de presentación del síndrome de lisis tumoral (Yang H, 1999) y de un síndrome de liberación de citocinas (Winkler U, 1999) que puede conducir a hipotensión y muerte y que puede prevenirse administrando el fármaco en infusión lenta.

- ***Anti CD52 (Alemtuzumab, Campath-1H)***

Activo frente a LLC y leucemia prolinfocítica, ha sido aprobado por la FDA para pacientes que no responden a agentes alquilantes y fludarabina (mutación p53) en lo que consigue 1/3 de respuestas globales, algunas completas (Keating MJ, 2002; Rai KR, 2002). Incrementa la susceptibilidad a infecciones oportunistas recomendándose estrategias profilácticas. Es poco efectivo en enfermedad "bulky" pero especialmente útil en enfermedad residual medular donde puede conseguir negativización molecular (Dyer MJ, 1997).

9.3. Anticuerpos monoclonales y quimioterapia

La combinación de fludarabina y rituximab en pacientes no tratados previamente puede conseguir un 90% de respuestas globales y casi un 50% de respuestas completas siendo los resultados inferiores cuando la administración de ambos fármacos es secuencial (Byrd JC, 2003). La administración conjunta de fludarabina, ciclofosfamida

y rituximab consigue todavía mejores resultados con cifras de 95%, y 75% respectivamente, con respuesta molecular en la mitad de los pacientes que alcanzan remisión completa (Keating MJ, 2003). También han sido descritos resultados esperanzadores en los pacientes tratados previamente (García-Manero G, 2001). Los efectos secundarios más importantes son citopenia e infecciones.

Alentuzumab también se ha combinado con fludarabina o rituximab en pacientes refractarios o recidivantes con respuestas prometedoras (Kennedy B, 2002; Faderl S, 2003).

9.4. Trasplante de células hematopoyéticas

El trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) no se ha utilizado ampliamente. La edad avanzada de los pacientes limitaba el trasplante alogénico y hasta la aparición de los análogos de purina, no fue posible la obtención de progenitores hematopoyéticos sin contaminación tumoral. Unos pocos estudios han evaluado la eficacia del trasplante alogénico y autólogo en la LLC. Estos trabajos están limitados por el pequeño tamaño de las muestras, la ausencia de seguimientos a largo plazo y la falta de grupo control en tratamiento farmacológico.

- ***Trasplante Alogénico***

Varios estudios han demostrado una elevada probabilidad de remisión completa incluso molecular en pacientes con enfermedad refractaria o recidivante (Michallet M, 1991; Rabinowe SN, 1993; Khouiri IF 1994). Una revisión que incluyó 54 pacientes que recibieron un trasplante de hermano HLA idéntico, demostró que la probabilidad de supervivencia a los 3 años era del 46%, pero casi la mitad de los pacientes murieron de complicaciones relacionadas con el tratamiento, la mayor parte de enfermedad injerto contra huésped (EICH) (Michallet M, 1996). Es incierta la evolución de estos pacientes si hubieran sido tratados solo con terapia farmacológica pero los datos sugieren que quizá los candidatos más adecuados puedan ser pacientes jóvenes resistentes a fludarabina ya que es bien conocido que este subgrupo de enfermos tienen muy mal pronóstico (Seymour JF, 1995) y algunos estudios sugieren un menor desarrollo de EICH y mayor supervivencia cuando antes del trasplante se han utilizado análogos de purina (Khouiri IF, 1997).

- ***Trasplante no mieloablativo (minitrasplante)***

Ha sido sugerido para intentar evitar la toxicidad de la quimioterapia intensiva y explotar el posible efecto injerto contra leucemia. En un estudio de 30 pacientes que recibieron terapia acondicionante con fludarabina, busulfán y globulina antitimocítica, el trasplante alogénico alcanzó remisión completa en un 40% y supervivencia libre de progresión a los 2 años del 67% (Schetelig J, 2003). Estos resultados sugieren su posible utilización en el grupo de pacientes de edad más avanzada.

- ***Trasplante autólogo***

Resultados preliminares sugieren que este procedimiento consigue un alto porcentaje de remisiones completas, bajo porcentaje de recidivas y efectos secundarios razonables cuando se utiliza con terapia de intensificación en remisión completa (Rabinowe SN, 1993; Khouri IF, 1994). La utilización previa de fludarabina para obtener remisión completa como terapia de primera línea no compromete la movilización de células stem (Michallet M, 2000). El estudio más extenso realizado en el Instituto Dana-Farber con 154 pacientes, puso de manifiesto que es un procedimiento seguro de baja mortalidad y una supervivencia libre de enfermedad a los 4 años del 65% (Kraakeart, 2001).

La persistencia de enfermedad mínima residual puede significar recaída de la enfermedad y por tanto es un factor predictivo su determinación por citometría de flujo o por análisis de reordenamiento del gen de la inmunoglobulina. En un reciente estudio de 58 pacientes con trasplante autólogo, los factores adversos que predijeron recurrencia molecular fueron: presencia de genes no mutados de la región variable de la cadena pesada de inmunoglobulinas, presencia de del 11q-, tiempo de duplicación linfocitaria <12 meses y recuento linfocitario con >50.000/ μ l (Ritgen M, 2003).

9.5. Otros procedimientos terapéuticos

- ***Leucoaféresis***

Está indicada en los casos de hiperviscosidad, habitualmente con cifras de leucocitos superior a 400.000/ μ l. Fuera de esta situación su utilización sólo consigue mejorías parciales transitorias (Cooper IA, 1979).

- ***Radioterapia***

Puede tener indicación en síntomas compresivos por grandes masas tumorales especialmente en pacientes que no responden a quimioterapia. El beneficio suele ser temporal (Johannsson J, 2002). La irradiación esplénica por dolor o citopenia consigue igualmente mejorías transitorias (Chisesi T, 1991).

- ***Esplenectomía***

En los pacientes con hiperesplenismo o citopenias autoinmunes que no responden a agentes quimioterápicos y/o esteroides, la esplenectomía es una mejor opción que la irradiación esplénica aunque la mortalidad perioperatoria no es despreciable en pacientes con mal estado general (Neal TF, 1992; Seymour JF, 1997).

9.6. Tratamiento de las complicaciones

- ***Infecciones***

Son una causa importante de morbimortalidad por hipogammaglobulinemia o neutropenia por fármacos entre otras razones. Son frecuentes las infecciones por bacterias Gram positivas, sobre todo gérmenes capsulados y Gram negativas, en forma sobre todo de infecciones sinobronquiales, y por el virus varicela-zoster (Tsiodras S, 2000; Hensel M, 2003). En caso de infecciones recurrentes, en presencia de hipogammaglobulinemia acusada, puede estar indicada la administración periódica de altas dosis de inmunoglobulinas intravenosas (Cooperative Group for the Study of Immunoglobulin in Chronic Lymphocytic Leukemia, 1986). El tratamiento con análogos de purina incrementa el riesgo de infecciones oportunistas por disfunción duradera de los linfocitos T (micobacterias, P. Carinii, Citomegalovirus, Herpes simple y Listeria monocitogenes) (Morrison VA, 2001; Anaissie EJ, 1998). En caso de neutropenia y fiebre con mala respuesta a los antibióticos puede estar indicada la asociación de factores

estimulantes de colonias de granulocitos (G-CSF) o de granulocito-macrófago (GM-CSF).

- ***Enfermedades autoinmunes***

La anemia o trombopenia autoinmunes, de incidencia mayor en los pacientes que han recibido análogos de purina (Myint H, 1995), deben tratarse con corticosteroides y si no hay respuesta adecuada, plantear esplenectomía o rituximab (Diehl LF, 1998; Iannitto E, 2002). La aplasia selectiva de la serie roja a veces precisa la combinación de corticosteroides y ciclosporina (Chikkappa G, 1987). Otras causas de anemia no autoinmune pueden necesitar eritropoyetina.

- ***Segundos tumores***

Los tumores sólidos o hematológicos, algunos en probable relación con la utilización previa de agentes alquilantes pero no de fludarabina, deben tratarse como los presentados “de novo”.

10. APOPTOSIS

Durante muchos años, la muerte celular fue considerada un proceso pasivo de destrucción celular que acontece, de manera irreversible, como consecuencia de factores externos a la célula y que comúnmente se denominaba necrosis. Fue hace treinta años, cuando los biólogos Wyllie y Kerr describieron un proceso de muerte celular distinto del anterior y que ellos denominaron muerte celular o apoptosis (Kerr JFR, 1972). A los hallazgos morfológicos siguieron los moleculares al estudiar el nematodo *Caenorhabditis elegans* y, posteriormente, con el descubrimiento de un patrón característico, en escalera, al plasmar el ADN de las células apoptóticas en un gel de electroforesis.

La apoptosis es una forma de muerte celular que se produce en respuesta a estímulos específicos y comprende una secuencia de fenómenos moleculares cuyo resultado final es la activación de las endonucleasas celulares y la fragmentación internucleosomal del ADN. Este proceso de muerte celular por apoptosis se diferencia muy bien, desde el punto de vista morfológico, del proceso de necrosis. La necrosis se

caracteriza por la edematización de las células, destrucción de sus organelas, rotura de la membrana citoplasmática y vertido del contenido celular al medio extracelular provocando una reacción inflamatoria local que lesiona las células adyacentes. La apoptosis, en cambio, se caracteriza por la contracción de las células y condensación picnótica del núcleo. Finalmente, las células se fragmentan en los denominados cuerpos apoptóticos, que son rápidamente fagocitados por los macrófagos adyacentes. A diferencia de lo que ocurre en la necrosis, la membrana y los orgánulos celulares se mantienen intactos, por lo que no se produce reacción inflamatoria local ni, por tanto, se dañan las células adyacentes (Wyllie AH, 1992; Arends MJ, 1990). La apoptosis se puede detectar e incluso cuantificar o analizar los mecanismos implicados por técnicas enzimáticas, inmunohistoquímicas, citométricas o moleculares (Vaquero M, 2000).

Actualmente, se reconoce que la apoptosis es una forma de muerte celular que está genéticamente regulada o programada durante el desarrollo evolutivo de los diferentes órganos (Wyllie AH, 1992). Acontece en respuesta a determinados estímulos (como citocinas) (Tartaglia LA, 1993), o se activa como consecuencia de determinadas lesiones celulares como las producidas por la isquemia (Gobé GC, 1990), la hipertermia (Harmon BV, 1990) y una gran variedad de toxinas. En los mamíferos interviene en el fenómeno cíclico de involución de los tejidos hormono-dependientes, como son las glándulas mamarias o el tejido endometrial, así como en otros procesos de involución fisiológica como la atresia de los folículos ováricos. En el sistema inmune, la apoptosis de los linfocitos cumple una gran variedad de funciones esenciales como es la eliminación de linfocitos T y B autorreactivos durante la maduración linfocitaria (Liu YJ, 1989).

En el proceso de la apoptosis se pone en marcha una maquinaria celular especializada que incluye a una familia de cisteín proteasas denominadas caspasas, las cuales son sintetizadas en forma inactiva y se activan por proteólisis. Las caspasas rompen los contactos establecidos con células adyacentes, reorganizan el citoesqueleto, destruyen el ADN, rompen la estructura nuclear e inducen a la célula a la formación de cuerpos apoptóticos. Entre las proteínas reguladoras de la apoptosis se encuentran los miembros de la familia Bcl-2 y las proteínas inhibidoras de la apoptosis (IAPs) (Ashkenazi A, 1998).

10.1. Apoptosis y cáncer

Cada vez es más evidente la importancia de la apoptosis en el desarrollo de las neoplasias. En definitiva, el desarrollo del cáncer es debido a la alteración del equilibrio existente entre la proliferación y la apoptosis celular, en un determinado tejido, el cual se encuentra genéticamente regulado por numerosos oncogenes, genes supresores de tumores y genes reguladores del ciclo celular. Por tanto, la neoplasia puede ser debida tanto a un exceso de proliferación como a una inhibición de la apoptosis, y dependiendo de la alteración genética existente, dicha neoplasia será producto de un exceso de proliferación, de un defecto en la apoptosis o de una alteración de ambos (Thompson CB, 1995).

Pero además de su implicación en el origen del tumor, la apoptosis presenta una vertiente terapéutica a través de su posible modulación (utilización de oligonucleótidos antisentido bcl-2, restaurar el gen p53) y representa el mecanismo de acción de muchos de los tratamientos actuales contra el cáncer, incluidos los empleados en el tratamiento de la LLC-B (Castejón R, 1997).

10.2. Apoptosis y LLC-B

La LLC-B se caracteriza por la acumulación lenta y progresiva de linfocitos B CD5+ monoclonales, aparentemente maduros. La mayoría de las células circulantes no se dividen y se considera que la supervivencia tan prolongada es debida a una disminución de la apoptosis, y que este último factor es el responsable de la acumulación de las células leucémicas (Rozman C, 1995).

La patogenia de la LLC-B se ha relacionado con diversos oncogenes o protooncogenes. Se han descrito translocaciones (a nivel de bcl-1, bcl-2, bcl-3), la sobreexpresión de bcl-2 y mutaciones en p53. Se considera que la sobreexpresión de bcl-2 origina la acumulación de células en G₀; sin embargo, la explicación completa es más compleja, ya que bcl-2 pertenece a una familia de genes que actúan de forma sinérgica con bcl-2 o contrarrestan su actividad (bcl-x, bcl-xs y bax) (Gottardi D, 1996; Crossen PE, 1997). La p53 está mutada en un 10-15 % de los casos de LLC-B, especialmente en pacientes con enfermedad avanzada, pobre supervivencia o en los que se ha producido transformación a linfoma de células grandes (Crossen, 1997). En estos casos de p53 anómala, no

se produce la inducción de apoptosis de las células B leucémicas, con la consiguiente acumulación celular.

A diferencia de lo que ocurre *in vivo* (acumulación celular), cuando se incuban células de LLC-B en medio de cultivo se produce apoptosis (Collins RJ, 1989). Por tanto, la apoptosis en células cultivadas de LLC-B puede ser producida por la ausencia de factores humorales o celulares, promotores de supervivencia *in vivo*, que reciben del microambiente. Algunas citocinas, como IL-4 y los interferones, inhiben la apoptosis espontánea de los linfocitos B de LLC-B y prolongan su viabilidad en cultivo (Castejón R, 1999; Berrocal E, 1997). Por otra parte, se ha descrito que el contacto con las células estromales de médula ósea, así como con células endoteliales vasculares, previene a los linfocitos B leucémicos de la apoptosis espontánea que tiene lugar en cultivo (Moreno A, 2001). Sin embargo, no se conoce con exactitud cuáles son las vías de señalización que están implicadas en el mantenimiento de la viabilidad de las células B de la LLC-B (Barragán M, 2003).

La detección de apoptosis incluye la observación de alteraciones morfológicas típicas, la demostración de un patrón en escalera en el análisis electroforético del ADN extraído, y tinciones que permiten identificar la fragmentación del ADN o la extrusión de la fosfatidilserina a la superficie externa de la célula. En este sentido la utilización de métodos citométricos que combinan la tinción con ioduro de propidio (entra en células con aumento de la permeabilidad de la membrana, como células necróticas y fases tardías de la apoptosis) con la tinción con anexina V (detecta fosfatidil serina en la superficie celular) ha permitido un estudio rápido, sensible y fiable de la apoptosis, incorporándose rápidamente a los laboratorios clínicos. En nuestro estudio, utilizando esta metodología, hemos valorado la apoptosis *in vitro* inducida por clorambucil y análogos de purina y su relación con la respuesta terapéutica *in vivo* a estos fármacos.

OBJETIVOS

El fallo en el mecanismo de apoptosis es básico para explicar la patogenia de la LLC-B. Los agentes alquilantes y los análogos de purina son capaces de inducir apoptosis en los linfocitos B de la LLC-B sugiriendo que la apoptosis es uno de los mecanismos implicados en su acción terapéutica. Ninguno de los dos grupos de tratamiento aisladamente es curativo y la respuesta clínica a ellos es impredecible. Aunque existen factores pronósticos de supervivencia, no son siempre útiles para definir la respuesta terapéutica.

La inducción *in vitro* de apoptosis por los diferentes quimioterápicos es un aspecto novedoso y de interés clínico no bien explorado. En este trabajo se realiza un estudio de inducción de apoptosis *in vitro* por clorambucil, fludarabina y 2-clorodeoxiadenosina en 50 pacientes con LLC-B, determinada por anexina V y citometría de flujo. Se utilizan concentraciones equivalentes a las alcanzadas en su uso farmacológico con objeto de establecer una posible correlación con la respuesta clínica de los pacientes y validar si el ensayo *in vitro* de inducción de apoptosis permite predecir la respuesta terapéutica *in vivo*.

Los objetivos del presente estudio son los siguientes:

1. Estudio de la inducción de apoptosis de los linfocitos B *in vitro* por clorambucil y análogos de purina (fludarabina, 2-clorodeoxiadenosina) con respecto a la apoptosis observada en ausencia de los fármacos.
2. Valorar la correlación entre los factores pronósticos clínicos y la apoptosis *in vitro* inducida por fármacos.
3. Valorar la correlación de la respuesta clínica al tratamiento quimioterápico y la apoptosis *in vitro* inducida por fármacos.

11. Conclusiones

Con respecto a los resultados

se concluye que la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

construcción de la

MATERIALES Y MÉTODOS

I. MATERIALES

1.1. Aparatos

- Cámara de flujo laminar (Telstar, Tarrasa, España)
- Incubador de cultivo celular Napro 6100 (Napro, Portland, USA)
- Centrífuga refrigerada Megafuge 1,0 R (Heraeus Instruments, Hanau, Alemania)
- Centrífuga de mesa ISS-112 emprotech (Bio-Synthesis D&I, Madrid, España)
- Microscopio óptico Leitz SM-LUX (Leitz, Wetzlar, Alemania)
- Citómetro de flujo FACSort (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA) con los programas informáticos para lectura y análisis de datos *Cell-Quest* y *Paint-a-Gate Pro*.

1.2. Reactivos

- Suero salino fisiológico Apiroserum clorurado simple (Cloruro sódico) (Ibys, Madrid, España)
- Buffer fosfato salino (PBS). Por cada litro de agua destilada se disolvieron: 8,75 g de PO_4HNa_2 ; 1,89 g de $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ y 4,25 g de ClNa ; se ajustó el pH a 7,4
- Lymphoprep TM, densidad 1077 (Nyegaard Co, Oslo, Noruega)
- Azul Tripán (Fluka, Chemische Fabrik, Buschs, SG)
- Medio RPMI 1640 (BioWhittaker, Verviers, Bélgica)
- L-Glutamina (Flow Lab, Irvine, CA, USA)
- Hepes 1M (BioWhittaker, Verviers, Bélgica)
- Mezcla antibiótica compuesta por: cloxacilina 500 mg, ampicilina 500 mg, gentamicina 80 mg (para 50 cc de medio)
- Suero bovino fetal (Gibco, Gran Island, NY, USA)
- Hematíes de carnero tratados con neuroaminidasa (Sigma chemical company, St Louis, USA)
- Clorambucil (ácido 4-[p-(bis 2-Cloroetilamino)- fenil] butírico) (Sigma chemical company, St Louis, USA)

- Fludarabina (2-Fluoroadenina 9- β -D-arabinofuranosido) (Sigma chemical company, St Louis, USA)
- 2-Clordeoxiadenosina, Leustatin (Ortho, Biotech Raritan, NJ, USA)
- Anticuerpos monoclonales de ratón frente a antígenos celulares humanos, conjugados con fluorocromos: anti-CD3 (SK7), anti-CD5 (L17F12), anti-CD19 (SJ25C1), anti-cadena ligera de las inmunoglobulinas λ ó κ , anti-CD22 (HIB22), anti-CD23 (M-L233), anti-CD38 (HB-7), anti-CD79b (CB3.1), anti-FMC7 y sus correspondientes isotipos (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA)
- Anexina V conjugada con isotiocianato de fluoresceína (Pharmingen, San Diego, CA, USA)
- Solución de unión de la anexina V (Pharmingen, San Diego, CA, USA)
- Ioduro de propidio (Sigma chemical company, St Louis, USA)

1.3. Pacientes

El estudio se realizó en muestras de sangre periférica obtenidas entre noviembre de 1996 y mayo de 2002 de 50 pacientes previamente diagnosticados de LLC-B de acuerdo a criterios clínicos, morfológicos e inmunológicos (Montserrat E, 1992). Los pacientes provenían del Servicio de Hematología y Medicina Interna del Hospital Universitario "Puerta de Hierro" de Madrid. De los 50 pacientes, 28 eran varones y 22 mujeres, con una edad media de 68 años (rango: 33-92) en el momento del estudio.

De cada uno de los pacientes incluidos en el estudio se recogieron los datos de la historia clínica relativos a la fecha de realización del ensayo *in vitro*, como son: edad, sexo, presencia de adenopatías y/o visceromegalias, así como su estadio clínico según la clasificación de Rai, de Binet. Estos datos aparecen descritos en la Tabla 3. Además, se recogieron las características analíticas, coincidentes con la fecha del estudio *in vitro*, correspondientes a la hemoglobina, número absoluto de leucocitos, linfocitos y plaquetas en sangre periférica, niveles de $\beta 2$ microglobulina, de láctico dehidrogenasa y de inmunoglobulinas séricas (Tabla 4).

La descripción del tiempo de duplicación linfocitaria (TDL), la morfología de los linfocitos en sangre periférica y el patrón morfológico de la médula ósea de cada paciente queda reflejado en la Tabla 5.

Se han estudiado algunas de las alteraciones citogenéticas más frecuentes en LLC-B o que han sido relacionadas como posibles factores pronóstico. Se emplearon técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para la detección de alteraciones como las que afectan al brazo largo de los cromosomas 6 y 11 (delección 6q, delección 11q), a la banda 14 del brazo largo del cromosoma 13 (delección 13q14), la delección de p53 y anomalías numéricas como la monosomía del cromosoma 18 o la trisomía del cromosoma 12. Además, se analizaron las posibles alteraciones en el cariotipo de los pacientes incluidos en el estudio considerando un cariotipo anormal aquel con una o dos alteraciones y cariotipo complejo, las muestras con tres o más alteraciones. Los estudios de citogenética fueron llevados a cabo por el Servicio de Hematología del Hospital Universitario "Puerta de Hierro" y los resultados quedan descritos en la Tabla 6.

De los 50 pacientes, 20 nunca recibieron tratamiento y 30 fueron tratados en algún momento de la evolución. Los detalles del tratamiento y el momento en que fueron tratados se exponen en el apartado primero de Resultados.

1.4. Obtención de las muestras

De cada paciente se obtuvo una muestra de entre 10 y 20 ml de sangre periférica mediante punción venosa. La muestra se recogió en tubos comerciales que contenían heparina sódica, procesándose en condiciones de esterilidad, en los 30 minutos siguientes a su extracción.

Tabla 3. Características clínicas y estadio de los pacientes con LLC-B

Paciente	Edad	Sexo	Adenopatías	Hepatomegalia	Esplenomegalia	Estadio de Binet	Estadio de Rai
1. NAP	67	V	N	N	P	A	II
2. LBG	71	V	Ax	N	N	A	I
3. JBC	86	V	N	N	N	A	0
4. JBS	45	V	C	N	P	A	II
5. MBM	77	H	Ax	N	N	A	I
6. JCM	55	V	Ab	N	P	A	II
7. ACC	72	H	N	P	N	A	II
8. JCD	47	V	C, Ax, I, Ab	N	P	C	IV
9. ACF	51	H	N	N	N	A	0
10. PCA	72	V	N	N	N	A	0
11. ACS	62	H	C	N	N	A	I
12. SCT	75	V	C, Ax, I, Ab	N	P	B	II
13. CDC	73	H	N	N	P	A	II
14. MFZ	75	V	C, Ax	N	N	A	I
15. MFF	72	H	C	N	N	A	I
16. FFN	58	V	C, Ax, I	N	N	B	I
17. MGG	79	V	Ax	N	N	A	I
18. AGG	67	V	C	N	P	C	IV
19. BGT	66	H	N	N	N	A	0
20. HGN	60	V	N	N	N	A	0
21. FGA	71	V	N	N	P	A	II
22. EHM	51	V	C, Ax	N	P	B	II
23. FIE	65	V	C, Ax, I	P	P	C	IV
24. PJJ	70	H	I	N	N	A	I
25. MLP	33	H	C, Ax, I	N	N	B	I
26. MLE	78	V	N	N	N	C	III
27. JLS	83	H	N	N	N	A	0
28. CMA	67	H	C, Ax, Ab	N	P	B	II
29. TMG	58	H	Ax	N	P	C	IV
30. TMJ	73	V	C, Ax, I	P	N	B	II
31. FMR	49	V	N	N	P	A	II
32. MMR	79	H	Ax, I	N	N	A	I
33. MMM	67	H	C	N	N	C	IV
34. AMG	71	H	Ax	N	N	A	I
35. IMP	48	V	N	N	N	A	0
36. PMP	73	H	C, Ax, I	N	P	B	II
37. JPV	92	V	N	N	N	A	0
38. MPC	68	H	C, Ax, Ab	N	N	*B	I
39. CPP	79	H	N	N	N	A	0
40. APP	81	H	C, Ax	N	N	A	I

Tabla 3 (cont.). Características clínicas y estadio de los pacientes con LLC-B

Paciente	Edad	Sexo	Adenopatías	Hepatomegalia	Esplenomegalia	Estadio de Binet	Estadio de Rai
41. JRJ	77	V	C, Ax	N	P	B	II
42. IRG	54	V	N	N	P	A	II
43. JRL	81	V	N	N	N	A	0
44. FSP	71	V	C, Ax	N	P	B	II
45. ESM	46	H	C	N	N	A	I
46. ASR	62	V	N	N	N	A	0
47. CTH	78	V	N	N	N	A	0
48. TVT	87	H	C, Ax, I, Ab	N	P	B	II
49. RVP	72	H	Ab	N	N	A	I
50. SYF	75	V	N	N	N	A	0

Tabla 3 .Características clínicas y estadio de los pacientes con LLC-B incluidos en el estudio. Se describe el sexo y la edad de cada uno de los pacientes en el momento del ensayo *in vitro*, así como si presentaban adenopatías (C: cervical, Ax: axilar, I: inguinal, Ab: abdominal, N: ausencia) o visceromegalias (P: presencia, N: ausencia) y su distribución en estadios clínicos según la clasificación de Rai y de Binet.

Tabla 4. Características analíticas de los pacientes con LLC-B

Paciente	Hemoglobina (g/dl)	Leucocitos (mm ³)	Linfocitos (mm ³)	Plaquetas (mm ³)	LDH (U/l)	$\beta 2$ M (mg/l)	IgG (mg/dl)	IgM (mg/dl)	IgA (mg/dl)
1. NAP	11,9	28500	26220	106000	311	3,66	4570	48	30
2. LBG	12,9	21800	19620	100000	306	1,65	640	42	114
3. JBC	14	30900	28428	113000	300	ND	434	9	420
4. JBS	14,7	43500	34800	70000	429	ND	586	40	213
5. MBM	13,2	83000	69720	340000	307	ND	732	66	56
6. JCM	13,5	9000	3033	424000	392	1,93	833	25	296
7. ACC	15	35800	28282	55000	392	ND	345	<4	13
8. JCD	10,6	156000	140400	78000	ND	ND	ND	ND	ND
9. ACF	12,4	24200	20570	201000	280	1,65	1880	35	25
10. PCA	12,8	17200	14792	126000	375	1,8	1280	114	178
11. ACS	13	16500	13365	152000	ND	ND	692	70	120
12. SCT	11,2	8800	6380	153000	434	3,94	1640	273	75
13. CDC	13	114700	90498	101000	366	1,83	706	21	77
14. MFZ	13,5	140800	123622	112000	520	2,4	323	20	41
15. MFF	14,3	23200	18745	194000	391	1,63	775	31	151
16. FFN	15,7	27100	22628	116000	441	1,61	898	33	67
17. MGG	15,1	30200	22348	282000	365	2,5	1080	20	348
18. AGG	11,6	70900	66646	76000	313	5,36	360	19	7
19. BGT	15,2	19700	13790	193000	347	ND	845	50	80
20. HGN	14	28500	22230	124000	289	ND	1050	63	161
21. FGA	14,3	37900	27477	136000	272	ND	ND	ND	ND
22. EHM	14,5	57500	49047	111000	291	2,66	564	9	66
23. FIE	11,2	95000	91200	127000	1006	ND	545	30	66
24. PJJ	13,9	30600	22001	251000	416	1,1	712	74	988
25. MLP	14,5	38800	33368	186000	271	ND	1440	77	99
26. MLE	9,9	39000	33228	155000	332	2,42	1020	29	43
27. JLS	13,5	5800	ND	217000	ND	ND	ND	ND	ND
28. CMA	10,4	95000	89300	141000	387	3,74	578	15	41
29. TMG	9,9	108000	101520	30000	ND	1,4	1050	65	44
30. TMJ	14,3	73600	52992	123000	351	2,1	1190	81	119
31. FMR	14,5	23700	15168	232000	273	1,06	875	73	193
32. MMR	13,9	13500	9585	135000	391	ND	733	24	112
33. MMM	8,5	6200	4712	39000	389	ND	249	46	11
34. AMG	14,3	70000	61600	230000	338	2,29	922	35	127
35. IMP	16,5	55100	51794	192000	414	1,41	758	77	133
36. PMP	12,9	28900	24565	131000	785	4	452	8	24
37. JPV	13,5	27700	20498	77000	524	ND	ND	ND	ND
38. MPC	12,4	14100	10575	426000	ND	ND	ND	ND	ND
39. CPP	13	17200	13398	147000	325	ND	1190	51	186
40. APP	12,3	61200	50184	142000	661	ND	924	14	113

Tabla 4 (cont.). Características analíticas de los pacientes con LLC-B

Paciente	Hemoglobina (g/dl)	Leucocitos (mm ³)	Linfocitos (mm ³)	Plaquetas (mm ³)	LDH (U/l)	β 2 M (mg/l)	IgG (mg/dl)	IgM (mg/dl)	IgA (mg/dl)
41. JRJ	11,4	14900	8940	139000	416	3,66	772	16	73
42. IRG	15,2	21000	17430	135000	305	1,75	236	4	20
43. JRL	12,1	11100	5472	217000	328	3,6	1090	53	242
44. FSP	15,4	50300	40240	91000	ND	ND	ND	ND	ND
45. ESM	13,7	13900	12232	168000	288	1,54	827	72	96
46. ASR	13,6	12400	7440	269000	277	ND	749	91	166
47. CTH	10,4	25300	20240	165000	700	ND	630	31	47
48. TVT	13,4	62000	51460	134000	389	ND	160	21	18
49. RVP	14,7	21800	16350	29800	378	2,4	611	11	145
50. SYF	14,5	29600	24568	148000	323	3,96	825	28	128

Tabla 4. Características analíticas de los pacientes con LLC-B incluidos en el estudio. Se recogieron los datos de hematometría, así como la cuantificación de láctico dehidrogenasa sérica (LDH), β 2 microglobulina (β 2 M) y las inmunoglobulinas séricas (IgG, IgM e IgA), de cada paciente coincidiendo con la fecha de realización del estudio *in vitro*.

Tabla 5. Otras características (TDL, médula ósea y morfología linfocitaria) de los pacientes con LLC-B

Paciente	TDL	Médula Osea	Morfología	Paciente	TDL	Médula Osea	Morfología
1. NAP	>12m	Intersticial	Atípica	26. MLE	>12m	ND	Típica
2. LBG	>12m	Mixta	Típica	27. JLS	ND	ND	ND
3. JBC	>12m	Intersticial	Atípica	28. CMA	<12m	Mixta	Atípica
4. JBS	>12m	Mixta	Atípica	29. TMG	<12m	Mixta	Atípica
5. MBM	>12m	ND	Típica	30. TMJ	>12m	Intersticial	Atípica
6. JCM	ND	Intersticial	Atípica	31. FMR	>12m	Intersticial	Atípica
7. ACC	>12m	Difusa	Atípica	32. MMR	ND	ND	ND
8. JCD	<12 m	Difusa	Atípica	33. MMM	ND	Intersticial	ND
9. ACF	>12m	Nodular	Atípica	34. AMG	>12m	ND	Típica
10. PCA	>12m	Nodular	Típica	35. IMP	>12m	Intersticial	Atípica
11. ACS	>12m	Mixta	Típica	36. PMP	>12m	Difusa	Atípica
12. SCT	>12m	Intersticial	Típica	37. JPV	ND	ND	ND
13. CDC	<12m	Mixta	Atípica	38. MPC	<12m	Intersticial	Atípica
14. MFZ	<12m	Difusa	Atípica	39. CPP	>12m	ND	Típica
15. MFF	<12m	Mixta	Típica	40. APP	>12m	ND	Atípica
16. FFN	>12m	Mixta	Típica	41. JRJ	>12m	Difusa	Atípica
17. MGG	>12m	Intersticial	Atípica	42. IRG	ND	ND	ND
18. AGG	>12m	Intersticial	Típica	43. JRL	>12m	Intersticial	Típica
19. BGT	>12m	Nodular	Típica	44. FSP	>12m	Nodular	Típica
20. HGN	>12m	Mixta	Típica	45. ESM	>12m	Mixta	Típica
21. FGA	>12m	Mixta	Típica	46. ASR	ND	Intersticial	ND
22. EHM	>12m	Intersticial	Típica	47. CTH	>12m	Intersticial	Típica
23. FIE	>12m	Intersticial	Atípica	48. TVT	ND	Mixta	ND
24. PJJ	>12m	Mixta	Atípica	49. RVP	>12m	Intersticial	Atípica
25. MLP	ND	ND	ND	50. SYF	>12m	Mixta	Atípica

Tabla 5. Otras características de los pacientes con LLC-B. Además de las características clínicas y analíticas de los pacientes de LLC-B incluidos en el estudio, se tuvieron en cuenta otra serie de parámetros como el tiempo de duplicación linfocitaria (TDL), la morfología de los linfocitos en sangre periférica y el patrón de la médula ósea. El TDL de cada paciente se determinó como inferior a 12 meses (<12m) o superior a 12 meses (>12m). La morfología de los linfocitos de sangre periférica se consideró como atípica en los casos que presentaban un elevado porcentaje de prolinfocitos y aquellos con linfocitos atípicos. No en todas las muestras pudieron obtenerse todas las determinaciones (ND: no determinado).

Tabla 6. Alteraciones cromosómicas de los pacientes con LLC-B

Paciente	Alteraciones detectadas por FISH						Cariotipo
	del 6q	del 13q	del 11q	del p53	Monosomía 18	Trisomía 12	
1. NAP	N	P	N	N	N	P	Anormal
2. LBG	N	N	N	N	N	N	Normal
3. JBC	N	P	N	N	N	N	Normal
4. JBS	P	N	N	P	N	P	Anormal
5. MBM	P	N	N	N	N	N	Anormal
6. JCM	N	N	P	N	N	N	Complejo
7. ACC	N	N	N	N	P	P	Anormal
8. JCD	N	N	N	P	N	P	Complejo
9. ACF	N	P	N	N	N	N	Normal
10. PCA	N	N	N	N	N	N	Normal
11. ACS	N	P	N	N	N	N	Normal
12. SCT	N	N	N	P	N	N	Normal
13. CDC	N	N	N	N	N	N	Anormal
14. MFZ	N	N	N	N	N	P	Anormal
15. MFF	N	N	N	N	P	N	Normal
16. FFN	N	P	N	N	N	N	Normal
17. MGG	N	N	N	N	N	P	Anormal
18. AGG	N	P	N	N	N	N	Normal
19. BGT	N	P	N	N	N	N	Anormal
20. HGN	N	N	N	N	N	N	Normal
21. FGA	N	P	N	N	N	N	Normal
22. EHM	N	N	N	N	N	N	Anormal
23. FIE	N	N	P	N	N	N	Anormal
24. PJJ	N	N	N	N	N	P	Anormal
25. MLP	ND	ND	ND	ND	ND	ND	Anormal
26. MLE	N	P	N	N	N	N	Normal
27. JLS	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
28. CMA	N	N	N	N	N	N	Normal
29. TMG	N	N	N	P	N	N	Complejo
30. TMJ	N	N	N	P	N	N	Anormal
31. FMR	N	N	P	N	N	N	Normal
32. MMR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
33. MMM	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
34. AMG	N	P	P	N	N	N	Complejo
35. IMP	N	N	N	N	P	P	Complejo
36. PMP	N	N	N	P	P	P	Complejo
37. JPV	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
38. MPC	N	P	N	P	N	N	Complejo
39. CPP	N	N	N	N	N	N	Normal
40. APP	N	N	N	N	N	P	Normal

Tabla 6 (cont.). Alteraciones cromosómicas de los pacientes con LLC-B

Paciente	Alteraciones detectadas por FISH						Cariotipo
	del 6q	del 13q	del 11q	del p53	Monosomía 18	Trisomía 12	
41. JRJ	N	N	N	N	N	N	Complejo
42. IRG	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
43. JRL	N	P	N	P	N	N	Normal
44. FSP	N	P	N	N	N	N	Normal
45. ESM	N	N	N	N	N	N	Normal
46. ASR	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
47. CTH	N	P	N	N	N	N	Normal
48. TVT	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
49. RVP	N	N	N	N	N	P	Anormal
50. SYF	N	N	N	N	N	N	Normal

Tabla 6. Estudio citogenético de los pacientes con LLC-B. Se emplearon técnicas de hibridación *in situ* fluorescente (FISH) para el estudio de algunas de las alteraciones citogenéticas descritas en pacientes con LLC-B, como deleciones que afectan al cromosoma 6 (del 6q), al cromosoma 11 (del 11q), al cromosoma 13 (del 13q), a p53 (del p53) y anomalías numéricas como la monosomía del cromosoma 18 o la trisomía del cromosoma 12. El cariotipo se definió como normal, anormal (con una o dos alteraciones) y complejo (con tres o más alteraciones). ND: no determinado.

2. MÉTODOS

2.1. Aislamiento de células mononucleadas y purificación de linfocitos B

Las muestras de sangre heparinizada procedentes de pacientes con LLC-B fueron procesadas con el fin de obtener la población de células mononucleadas de sangre periférica (CMSP). Para ello cada muestra fue diluida 1:2 ó 1:4 en suero salino fisiológico (SSF), dependiendo del conteo leucocitario previo. Las células mononucleadas se aislaron mediante centrifugación diferencial en un gradiente de densidad sobre ficoll (Böyum AJ, 1968). Tras recoger la fase que contenía las células mononucleadas (linfocitos, células NK y monocitos), se lavaron 3 veces con SSF y se resuspendieron en medio completo (RPMI con L-glutamina 2mM, Hepes 10mM y mezcla antibiótica al 1%) suplementado con un 10% de suero bovino fetal (SBF), hasta alcanzar una concentración aproximada de 5×10^6 células/ml.

La subpoblación de linfocitos B purificados se aisló mediante selección negativa, utilizando la propiedad que tienen los linfocitos T de agregarse espontáneamente a la membrana de hematíes de carnero tratados con 2-aminoethylisothiouroniumbromide (AET), formando rosetas y posterior centrifugación en gradiente de densidad sobre ficoll (Jondal M, 1972).

La viabilidad y la concentración celular se valoraron mediante la exclusión del colorante vital azul tripán al 0.2% y conteo por microscopía directa. La purificación de linfocitos B se comprobó mediante un marcaje linfocitario con anticuerpos monoclonales anti-CD3, anti-CD19, anti-CD5, conjugados con isotiocianato de fluoresceína o ficoeritrina y posterior cuantificación por citometría de flujo, obteniendo en todos los casos una purificación de células B leucémicas (CD19+ CD5+) superior al 95%.

2.2. Marcaje de antígenos de la superficie celular por inmunofluorescencia

Las diferentes subpoblaciones presentes en la fracción de células mononucleadas obtenidas de la sangre periférica de cada uno de los pacientes, se identificaron utilizando varias combinaciones de anticuerpos monoclonales (mAc) específicos. El

antígeno de membrana celular que se utilizó para identificar los linfocitos T presentes en la muestra fue CD3. Para la identificación de los linfocitos B leucémicos, los marcadores de superficie elegidos fueron CD19 y CD5. Además, se determinó la expresión monoclonal de las inmunoglobulinas (κ ó λ) por los linfocitos B de LLC, su grado de activación (CD22, CD23) y otros marcadores característicos de esta neoplasia (CD79b, FMC7, CD38 y ZAP-70).

Para ello se empleó la técnica de inmunofluorescencia directa con mAc conjugados con distintos fluorocromos: isotiocianato de fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) y Tri-color® (TC). En todos los casos se incorporó un marcaje con anticuerpos isotipo inespecíficos que permitiera identificar la especificidad del marcaje.

El marcaje de los antígenos linfocitarios de membrana plasmática se mantuvo durante 20 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Tras la incubación, el exceso de anticuerpos se eliminó con un lavado de las células en PBS. Las concentraciones de los anticuerpos empleadas fueron las recomendadas por el fabricante. La lectura y análisis de los resultados se llevó a cabo en un citómetro de flujo *FACSort* con el programa informático *Cell-Quest* y *Paint-a-Gate Pro*.

2.3. Inducción de apoptosis *in vitro* por agentes quimioterápicos

Las células B purificadas fueron cultivadas en medio completo suplementado con un 10% de SBF, a una concentración de 2×10^6 células/ml, en placas de 24 pocillos con un volumen final de 2ml/pocillo. Todos los cultivos celulares se realizaron en condiciones de esterilidad, manteniéndose a 37° C de temperatura en atmósfera con 5 % de CO₂ y 95% de humedad relativa.

Con objeto de analizar la inducción de apoptosis *in vitro* por los fármacos quimioterápicos más frecuentes en el tratamiento de la LLC-B, se establecieron cultivos celulares en ausencia o presencia del agente alquilante clorambucil y los análogos de purina fludarabina y 2-clorodeoxiadenosina. El análisis de la apoptosis se llevó a cabo a las 24 y 48 horas de cultivo.

Las dosis de los agentes quimioterápicos empleados en el ensayo intentan aproximarse a las alcanzadas en el suero de los pacientes cuando se les suministra el tratamiento *in vivo*, tratando de emular las condiciones fisiológicas reales de modo que puedan establecerse equivalencias entre las respuestas *in vitro/in vivo*. Así, la

concentración final de clorambucil en el cultivo fue de 10µg/ml (Begleiter A, 1991; Silber R, 1994; Begleiter A, 1996) y la de fludarabina de 1µg/ml (Chun HG, 1991; Zinzani PL, 1994; Begleiter A, 1995). En los experimentos con 2-clorodeoxiadenosina se empleó una dosis de 50ng/ml, descrita como la equivalente a la concentración alcanzada *in vivo* (Liliemark J, 1991).

2.4. Determinación y cuantificación de la apoptosis

El método óptimo para identificar la muerte celular depende del sistema celular, de la naturaleza de sus agentes inductores o del modo en que ésta se produzca. Los patrones morfológica y estructuralmente definidos que caracterizan la apoptosis nos ayudan en la selección del método de análisis de las células apoptóticas. Los métodos clásicos de identificación de apoptosis incluyen la microscopía óptica o electrónica que revela los cambios morfológicos (Raff MC, 1992) y la detección de la fragmentación del ADN por endonucleasas específicas mediante electroforesis en gel de agarosa (Wyllie AH, 1980) o mediante marcaje fluorescente *in situ* de los extremos de los fragmentos de ADN (Gorczyca W, 1992; Wijsman JH, 1993).

Uno de los acontecimientos que tienen lugar en las primeras fases de la apoptosis es el cambio de localización de los fosfolípidos de la membrana plasmática (Fadok VA, 1992). Asimismo, las células en apoptosis sufren una disminución del volumen celular debido a modificaciones en el citoesqueleto. Estas características que definen este tipo de muerte celular han permitido el diseño de métodos específicos para la identificación y cuantificación de las células en proceso de apoptosis.

A. Detección del cambio en la localización de los fosfolípidos de membrana plasmática mediante el marcaje con Anexina V FITC/Ioduro de propidio

En la membrana plasmática de las células vivas los fosfolípidos se encuentran distribuidos asimétricamente entre la superficie interna y la externa de la membrana. Así, mientras la fosfatidilcolina y la esfingomielina están expuestas en la superficie externa de la bicapa lipídica, la fosfatidilserina se localiza en la superficie interna. Se ha descrito que uno de los acontecimientos que tienen lugar en la apoptosis temprana es la

exposición de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática (Fadok VA, 1992).

La anexina V es un anticoagulante que se une preferentemente a los fosfolípidos cargados como la fosfatidilserina. De este modo, la anexina V conjugada con un fluorocromo puede usarse como un marcador para identificar células apoptóticas por citometría de flujo (Koopman G, 1994; Castedo M, 1996). Durante la apoptosis la célula se marca con anexina V después de la condensación de la cromatina, pero antes de que la membrana resulte dañada y pierda la capacidad de excluir un colorante como el yoduro de propidio. Así, incubando células con una combinación de anexina V fluoresceinada y yoduro de propidio (IP) es posible detectar células vivas (Anexina V negativas/IP negativas), células en apoptosis temprana (Anexina V positivas/IP negativas) y células en apoptosis tardía (Anexina V positivas/IP positivas) y necróticas (Anexina V negativas/IP positivas) por citometría de flujo.

El método consiste en incubar durante 15 minutos, a temperatura ambiente y en oscuridad, 5×10^5 linfocitos B con 5 μ l de anexina V-FITC en presencia de una solución de unión rica en Ca^{+2} (140mM NaCl, 5mM CaCl_2 , y 10mM Hepes). Transcurrida la incubación, las células se resuspenden en una solución 5 μ g/ml de yoduro de propidio antes de analizarse por citometría de flujo. La determinación de la apoptosis debe realizarse tan pronto como sea posible para evitar el deterioro de las células y la aparición de falsos positivos.

B. Detección de la disminución del volumen celular

La disminución del volumen celular y el aumento de granularidad del citoplasma que caracterizan a la muerte por apoptosis, se traducen en modificaciones de las propiedades de dispersión de la luz determinadas mediante citometría de flujo: dispersión de luz hacia delante (FSC; Forward Scatter, equivalente al tamaño celular) y dispersión de la luz lateral (SSC; Side Scatter, equivalente a la granularidad celular).

Los diagramas que representan FSC vs SSC confirman la existencia de una subpoblación linfocitaria con menor volumen celular, correspondiente al conjunto de células en apoptosis en cada una de las muestras.

En la Figura 1 se muestra un ejemplo de la determinación y análisis de la apoptosis mediante citometría de flujo.

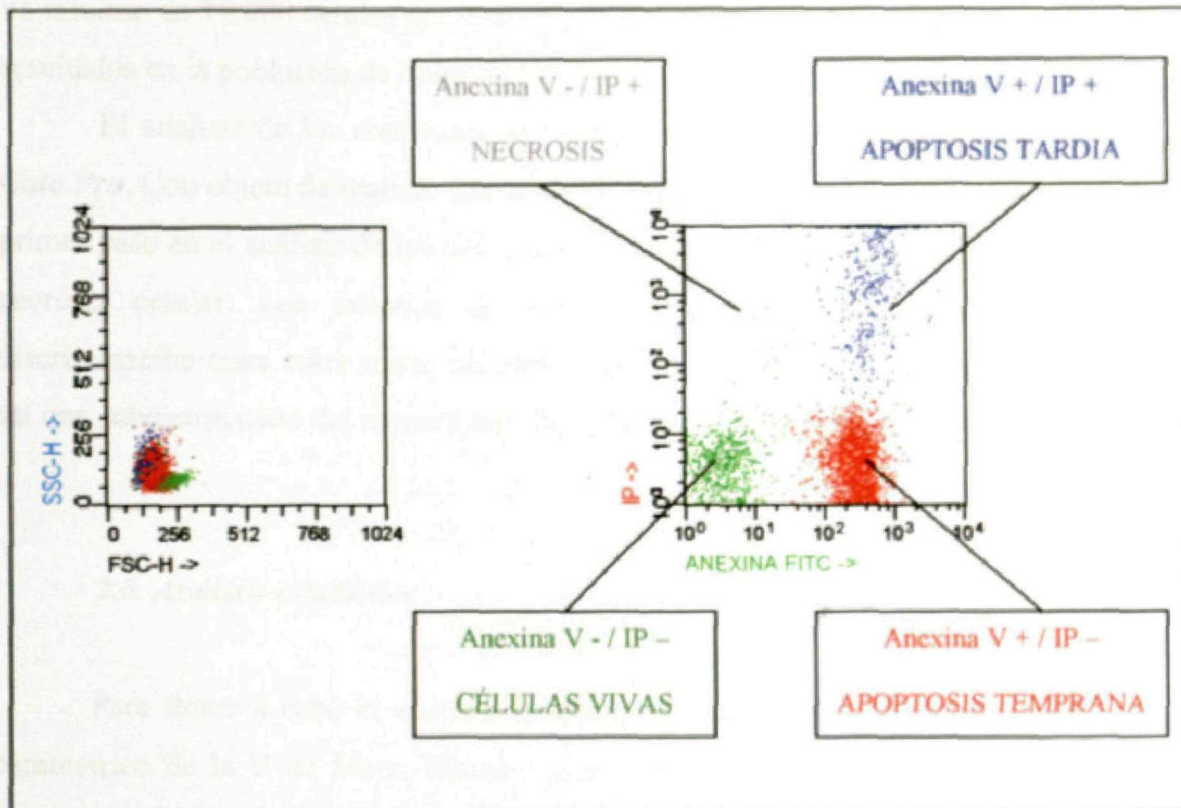


Figura 1. Cuantificación de la apoptosis por citometría de flujo. A la izquierda se muestra un diagrama representando el tamaño y la granularidad de los linfocitos B de los pacientes con LLC-B. En la imagen de la derecha se muestra un diagrama de fluorescencia en el que se indican las células viables (verde), las células apoptóticas (apoptosis temprana en rojo, y tardía en azul), y las células necróticas (gris).

2.5. Adquisición de muestras y análisis de los resultados

A lo largo de todo el estudio, la identificación y cuantificación de las células apoptóticas se ha realizado mediante técnicas de citometría de flujo. La adquisición de las muestras se realizó con un citómetro de flujo FACSsort y el programa informático *Cell-Quest*, siguiendo las instrucciones del fabricante. En todos los casos se adquirieron un mínimo de 10.000 células por muestra, lo que permite realizar una estimación de los resultados en la población de linfocitos.

El análisis de los resultados se efectuó con el programa *Cell-Quest* y *Paint-a-Gate Pro*. Con objeto de realizar una cuantificación precisa de las células apoptóticas, el primer paso en el análisis de los datos fue excluir los restos celulares provenientes de la necrosis celular. Los criterios de tamaño y complejidad celular permiten una discriminación clara entre restos celulares, células vivas y células apoptóticas, evitando así una sobrestimación del número de células en apoptosis (Zamai L, 1993). (Figura 1)

2.6. Análisis estadístico

Para llevar a cabo el análisis estadístico de los resultados, se utilizó el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney para efectuar comparaciones entre medias, ya que las variables estudiadas no seguían distribuciones normales. El test de normalidad se llevó a cabo por la prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov. Para relacionar dos variables cuantitativas, se utilizó la correlación de Spearman. La comparación entre variables cualitativas se evaluó por la prueba Chi-cuadrado con la corrección de continuidad de Yates.

Los resultados de las variables se expresaron en forma de medias y desviaciones estándar. En todas las comparaciones realizadas, se consideraron niveles de significación estadística por debajo del 5% ($p < 0,05$). Todos los estudios comparativos se realizaron con el programa informático "SPSS versión 10.0".

RESULTADOS

1. TRATAMIENTO Y RESPUESTA CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON LLC-B

Los 50 pacientes con LLC-B, motivo del estudio, fueron divididos en dos grupos:

1. Los pacientes que nunca recibieron tratamiento quimioterápico (n=20).
2. Los pacientes que en algún momento recibieron tratamiento quimioterápico (n=30). Este grupo se subdividió en cuatro con respecto a la fecha en la que se realizaron los ensayos *in vitro* de apoptosis.
 - a) Los pacientes que recibieron tratamiento previo a la realización del estudio *in vitro*, entendiéndose como previo si había pasado un tiempo igual o mayor a 6 meses (n=8).
 - b) Los pacientes que estaban recibiendo tratamiento durante el momento del estudio *in vitro* o lo habían recibido en los 6 meses previos (n=5).
 - c) Los pacientes que habían recibido tratamiento previo y además lo estaban recibiendo en la fecha del estudio *in vitro* (n=2)
 - d) Los pacientes que sólo recibieron tratamiento posteriormente a la fecha del estudio (n=15).

Los pacientes de los grupos a, b y c, pudieron recibir tratamiento posteriormente al estudio *in vitro*.

Los pacientes recibieron varias combinaciones terapéuticas, que resumimos en:

1. Grupo Alquilante (GA) (21 pacientes y 31 episodios terapéuticos). Fueron aquellos pacientes que recibieron como tratamiento fundamental agentes alquilantes, bien sólo -clorambucil ó ciclofosfamida (13 pacientes y 16 episodios terapéuticos)-, asociados con prednisona (10 pacientes y 13 episodios terapéuticos) o asociados con prednisona y vincristina (2 pacientes y 2 episodios terapéuticos).
2. Grupo Análogos de Purina (GP) (18 pacientes y 18 episodios terapéuticos). Fueron aquellos pacientes que recibieron como tratamiento fundamental análogos de purina, bien sólo -fludarabina ó 2-clorodeoxiadenosina (6 pacientes y 6 episodios terapéuticos)-, asociados a agentes alquilantes (ciclofosfamida) (9 pacientes y 9 episodios terapéuticos) o asociados a agentes alquilantes y mitoxantrona (3 pacientes y 3 episodios terapéuticos).

Algunos pacientes fueron tratados además con otras opciones: poliquimioterapia tipo CHOP (ciclofosfamida, adriamicina, vincristina y prednisona) (paciente número 8), anticuerpos monoclonales (rituximab o alentuzumab) (pacientes número 8 y 38) y trasplante de progenitores hematopoyéticos (pacientes números 22, 25, 29 y 45); pero estos tratamientos siempre se utilizaron posteriormente a los agentes alquilantes y a los análogos de purina. Las respuestas a estos tratamientos no será considerada como parte del estudio.

En el GA se consideró que se podían estudiar conjuntamente clorambucil y ciclofosfamida porque los resultados terapéuticos en la bibliografía médica son semejantes. Aunque la adición de prednisona a los agentes alquilantes consigue, de forma modesta, mejores respuesta clínicas, consideramos que el efecto fundamental se debía al agente alquilante; por lo que fueron clasificados en el mismo grupo. No obstante, se intentó en los análisis posteriores analizar también ambos grupos: el Grupo Alquilante sin prednisona (GAsp) y el Grupo Alquilante con prednisona (GAcp). La adición de vincristina a ciclofosfamida y prednisona (CVP) no aporta mayores ventajas, por lo que se incluyó en el GAcp.

En el GP se consideró indistintamente fludarabina y 2-clorodeoxiadenosina (2-CdA) porque ambos agentes han demostrado respuestas clínicas semejantes. Aunque la adición de agentes alquilantes (ciclofosfamida) (FC) o de agentes alquilantes y mitoxantrona (FCM) ha demostrado que consigue, de forma modesta, mejores respuestas clínicas, consideramos que el efecto fundamental se debe a los análogos de purina; por ello fueron clasificados en el mismo grupo. El escaso número de pacientes que recibieron como agente terapéutico aislado fludarabina o 2-CdA impidió analizar estos subgrupos por separado.

El número de pacientes no coincidió con el número de tratamientos (episodios terapéuticos), ya que frecuentemente los pacientes recibían secuencialmente varios tratamientos del mismo o de distinto grupo terapéutico. Las razones de cambio terapéutico en cada paciente individual no son expuestas.

Las respuestas clínicas al tratamiento con agentes del GA o del GP fueron clasificadas siguiendo las directrices del INC-WILLC (Cheson BD, 1996) en Respuesta Completa (RC), Respuesta Parcial (RP), Enfermedad Estable (EE) y Enfermedad Progresiva (EP). Se consideró Respuesta (R) a la conseguida en los pacientes con RC ó RP y No Respuesta (NR) a la conseguida en los pacientes con EE ó EP.

El análisis del tipo de respuestas en los distintos grupos fue el siguiente:

1. El total de los pacientes tratados con GA y/o con GP fue de 30. El número de episodios terapéuticos de estos 30 pacientes fue de 49. Estos intentos terapéuticos fueron seguidos de un número de R de 29 y de un número de NR de 19. El paciente número 4 no pudo ser evaluado porque falleció precozmente tras el tratamiento.
2. El número de pacientes tratados con GA fue de 21. Es estos pacientes el número de episodios terapéuticos fue de 31. Estos intentos terapéuticos fueron seguidos de un número de R de 14 y de un número de NR de 17. Los pacientes que recibieron más de una pauta terapéutica perteneciente a este mismo grupo siempre tuvieron el mismo tipo de respuesta (R ó NR), excepto el paciente número 5 que respondiendo (R) inicialmente a CVP, no respondió (NR) por dos veces consecutivas a clorambucil.
3. El número de pacientes tratados con GP fue de 18. Es estos pacientes el número de episodios terapéuticos fue de 18. Estos intentos terapéuticos fueron seguidos de un número de R de 15 y de un número de NR de 2. El paciente que recibió 2-CdA no pudo ser evaluado ya que falleció antes de que transcurriera el tiempo suficiente como para apreciar respuesta clínica. Ningún paciente de este grupo recibió más de una pauta terapéutica del mismo grupo, por lo que coincide el número de pacientes con el número de episodios terapéuticos.

La descripción del tratamiento de cada paciente y el tipo de respuesta clínica queda reflejado en la Tabla 7 y Tabla 8.

Tabla 7. Clasificación de los pacientes con LLC-B por grupos terapéuticos y número de episodios terapéuticos con el número de respuesta por grupo

GRUPO TERAPÉUTICO	Número de Pacientes	Número de Episodios	Respuesta	No Respuesta
GRUPO ALQUILANTE (GA)	21	31	14	17
Clorambucil o Ciclofosfamida	13	16	4	12
Clorambucil o Ciclofosfamida + Prednisona	10	13	8	5
Ciclofosfamida + Vincristina + Prednisona	2	2	2	0
GRUPO ANÁLOGOS DE PURINA (GP)	18	18	15	2
Fludarabina o 2-Clorodeoxiadenosina	6	6	3	2
Fludarabina + Ciclofosfamida	9	9	9	0
Fludarabina + Ciclofosfamida + Mitoxantrona	3	3	3	0

Tabla 7. Tratamientos y respuestas clínicas de los pacientes de LLC-B. El número total de pacientes tratados con GA y GP (30) no coincide con la suma del número de pacientes tratados con GA (21) y con GP (18), porque algunos pacientes se encuentran en ambos grupos de tratamiento. En el GA el número de pacientes (21) no coincide con la suma del número de pacientes tratados con opciones terapéuticas porque algunos pacientes se encontraban en más de una de las opciones. En el GP, el número de episodios (18) no coincide con la suma de respondedores (15) y no respondedores (2) porque un paciente (el número 2) no fue evaluado y por la misma razón, el número total de episodios terapéuticos (49) no coincide con la suma de los respondedores (29) y los no respondedores (19).

Tabla 8. Esquema terapéutico de cada uno de los pacientes con LLC-B y el tipo de respuesta en cada episodio terapéutico

Tratamientos Farmacológicos y tipo de Respuestas Clínicas							Fecha
Paciente	Episodio 1	Respuesta	Episodio 2	Respuesta	Episodio 3	Respuesta	
1. NAP	CI P	RP	CI	RP			pr
4. JBS	CI P	EP	2CdA	NE			pt
5. MBM	CI	EP					pt
6. JCM	FCM	RP	CI	EE			cc - pt
7. ACC	CVP	RP	CI	EE	CI	EP	pr
8. JCD	CI	EP	F	EP			cc pt
13. CDC	CI	RP					pt
14. MFZ	FC	RC					pt
18. AGG	CI P	RP	CVP	RP			pr - pt
20. HGN	FC	RP					pt
22. EHM	FC	RP					pt
23. FIE	CI P	RP	CI P	RP	FCM	RC	cc - pt
25. MLP	FC	RP					pt
26. MLE	CI	EE					pr
27. JLS	CI P	EE	CI P	EE			pr
28. CMA	CI	RP	FC	RP			pr - pt
29. TMG	CI	EP	F	EE			pr
30. TMJ	FC	RP					pt
33. MMM	CI	EP	CI P	EE	CI	EP	pr - cc
34. AMG	FC	RP					pt
35. IMP	F	RP					pt
36. PMP	CI P	EP	FCM	RP			cc - pt
38. MPC	CI	EP	F	RP			pt
40. APP	CI P	RP					pt
41. JRJ	FC	RP					pt
44. FSP	CI P	RP	F	RP			pr - pt
45. ESM	FC	RP					pt
47. CTH	CI P	RP	CP	RC			cc - pt
48. TVT	CI	EE	CI	EP			pr - cc
50. SYF	CI	RP					pt

Tabla 8. Tratamiento recibido por cada uno de los pacientes incluidos en el estudio y tipo de respuesta clínica que presentaron. Tratamiento. CI: clorambucil, C: ciclofosfamida, P: prednisona, CI P: clorambucil + prednisona, CP: ciclofosfamida + prednisona, CVP: ciclofosfamida + vincristina + prednisona, 2CdA: 2-clorodeoxiadenosina, F: fludarabina, M: mitoxantrona, FC: fludarabina + ciclofosfamida, FCM: fludarabina + ciclofosfamida + mitoxantrona. Respuesta clínica. RC: respuesta completa, RP: respuesta parcial, EE: enfermedad estable, EP: enfermedad progresiva, NE: no evaluable. Fecha en que recibieron el tratamiento con respecto a la realización del ensayo in vitro. pr: previo, cc: concomitante, pt: posterior.

2. APOPTOSIS ESPONTÁNEA E INDUCIDA POR FÁRMACOS (CLORAMBUCIL, FLUDARABINA Y 2-CLORODEOXIADENOSINA) EN LINFOCITOS B DE SANGRE PERIFÉRICA DE LOS PACIENTES CON LLC-B

Se extrajo una muestra de sangre periférica por paciente. Tras purificación de los linfocitos B, se cuantificó de forma inmediata el porcentaje de apoptosis basal (*ex vivo*). Seguidamente se analizó el porcentaje de linfocitos B que habían sufrido un proceso de apoptosis espontánea *in vitro* tras 24 y 48 horas de cultivo y el porcentaje de apoptosis inducida por clorambucil, fludarabina y 2-CdA a las 24 y 48 horas. Estas determinaciones se realizaron en las condiciones estándar descritas en materiales y métodos.

El valor de la respuesta que presentaban los linfocitos B tratados *in vitro* con agentes quimioterápicos se calculó como una relación entre el porcentaje de apoptosis (precoz y tardía) inducida por el fármaco (clorambucil, fludarabina y 2-clorodeoxiadenosina) y el porcentaje de apoptosis espontánea (índice de apoptosis). El índice de apoptosis se calculó a las 24 y 48 horas.

$$\text{Índice de apoptosis} = (\% \text{ apoptosis inducida por fármacos}) / (\% \text{ apoptosis espontánea})$$

En la Tabla 9 se describen los porcentajes de apoptosis *ex vivo*, espontánea e inducida por fármacos (clorambucil, fludarabina y 2-Clorodeoxiadenosina) tras 24 y 48 horas de incubación *in vitro*.

Tabla 9. Porcentajes de apoptosis espontánea e inducida por fármacos tras 24 y 48 horas de incubación

Paciente	Ex vivo	Apoptosis Espontánea		Inducida por Clorambucil		Inducida por Fludarabina		Inducida por 2-Clorodeoxiadenosina	
		24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
1. NAP		48,0	64,0	55,0	73,0	49,0	74,0	52,0	75,0
2. LBG	0,0	14,8		14,9		28,1		30,6	
3. JBC	4,6	28,9	30,8	83,7	76,5	37,1	64,2	35,6	45,1
4. JBS	3,9	25,3	25,0	64,6	87,8	29,1	77,2	32,9	50,7
5. MBM	1,7	19,0	13,0	59,4	62,9	28,7	68,6	23,9	72,5
6. JCM		54,0		67,6		72,1		83,2	
7. ACC	3,3	30,8	35,1	88,5	80,3	44,1	77,4	44,7	46,3
8. JCD	8,9	49,3	40,3	75,6	84,5	37,9	42,3	53,3	46,4
9. ACF		10,0	14,0	10,0	17,0	15,0	55,0	20,0	55,0
10. PCA		10,0	12,0	26,0	39,0	15,0	48,0	25,0	43,0
11. ACS	11,1	55,5	55,2	92,0	76,8	57,4	70,4	65,1	64,8
12. SCT		10,0	15,0	12,0	18,0	13,0	30,0	14,0	28,0
13. CDC		56,0	63,0	61,0	80,0	61,0	83,0	76,0	76,0
14. MFZ		27,0	28,0	35,0	59,0	35,0	76,0	34,0	62,0
15. MFF		8,0	22,0	11,0	35,0	14,0	53,0	16,0	56,0
16. FFN		14,0	24,0	16,0	38,0	24,0	82,0	21,0	79,0
17. MGG		58,0	71,0	70,0	82,0	75,0	89,0	77,0	89,0
18. AGG		23,0	35,0	23,0	33,0	26,0	48,0	27,0	41,0
19. BGT	3,4	33,9		82,6		50,7		55,5	
20. HGN	4,5	68,8	48,8	91,3	98,9	70,4	88,5	64,1	96,7
21. FGA		69,0	83,0	65,0	84,0	72,0	91,0	72,0	92,0
22. EHM		27,0	38,0	39,0	61,0	35,0	72,0	39,0	66,0
23. FIE	3,3	60,3		91,1		73,6		73,1	
24. PJJ		21,0	23,0	38,0	57,0	45,0	77,0	56,0	82,0
25. MLP	7,8	54,9	36,2	91,7	77,9	57,9	79,9	53,2	65,3
26. MLE		29,0	38,0	32,0	36,0	36,0	62,0	52,0	54,0
27. JLS	3,4	44,7	39,7	29,5	80,1	65,9	65,2	62,2	71,2
28. CMA		83,0	85,0	83,0	87,0	84,0	89,0	83,0	89,0
29. TMG		16,0	18,0	22,0	30,0	14,0	20,0	20,0	26,0
30. TMJ		32,0	29,0	36,0	36,0	50,0	80,0	45,0	67,0
31. FMR		34,0	40,0	40,0	57,0	50,0	85,0	45,0	72,0
32. MMR	16,9	62,9		75,1		73,4		71,2	
33. MMM	3,5	35,7		58,3		58,3		57,6	
34. AMG		45,8		75,2		63,6		59,0	
35. IMP		60,0	64,0	66,0	76,0	64,0	79,0	76,0	85,0
36. PMP	3,5	46,5		43,1		37,7		42,7	
37. JPV	2,7	30,7	32,5	95,4	80,2	43,0	86,1	47,9	80,8
38. MPC		70,8		69,2		52,6		69,3	
39. CPP		29,4		85,2		68,9		62,3	
40. APP	3,0	27,7		89,5		53,6		50,4	

Tabla 9 (cont.). Porcentajes de apoptosis espontánea e inducida por fármacos tras 24 y 48 horas de incubación

Paciente	Ex vivo	Apoptosis Espontánea		Inducida por Clorambucil		Inducida por Fludarabina		Inducida por 2-Clorodeoxiadenosina	
		24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
41. JRJ		23,0	23,0	25,0	29,0	31,0	61,0	34,0	55,0
42. IRG		38,0	40,0	48,0	61,0	63,0	79,0	48,0	74,0
43. JRL		6,0		7,0		7,0		8,0	
44. FSP		21,0	28,0	27,0	39,0	27,0	63,0	37,0	64,0
45. ESM		38,2		73,5		48,6		43,9	
46. ASR	3,1	31,0		79,3		50,2		58,0	
47. CTH	4,5	25,8		83,3		49,8		54,1	
48. TVT	0,0	14,3		16,0		35,1		56,8	
49. RVP		43,0	53,0	51,0	72,0	61,0	80,0	64,0	80,0
50. SYF	6,7	41,7	42,2	91,1	56,6	84,2	59,9	75,6	85,5
<i>n</i>	21	50	34	50	34	50	34	50	34
Media	4,8	36,1	38,5	55,3	60,6	46,8	69,3	49,3	65,7
D. S.	3,8	18,8	19,2	27,9	22,8	20,1	17,1	19,5	18,0
Min	0,0	6,0	12,0	7,0	17,0	7,0	20,0	8,0	26,0
Max	16,9	83,0	85,0	95,4	98,9	84,2	91,0	83,2	96,7

Tabla 9. Apoptosis espontánea e inducida por fármacos *in vitro* tras 24 y 48 horas de incubación. Se representan los porcentajes de linfocitos B que han sufrido un proceso de apoptosis espontánea *in vitro*, así como los que se obtienen en presencia de clorambucil, fludarabina y 2-clorodeoxiadenosina en el medio de cultivo, tras 24 horas (50 muestras) y 48 horas (34 muestras) de incubación. Asimismo, se determinó la apoptosis de los linfocitos B en el momento de la extracción de sangre periférica de los pacientes (*ex vivo*). En la tabla aparecen los valores de la media aritmética, desviación estándar (D.S.), valor mínimo y máximo de los porcentajes de células en apoptosis en cada una de las diferentes condiciones *in vitro*.

2.1. Valores de apoptosis *ex vivo*

Este ensayo se realizó en 21 muestras y se observó que el porcentaje de células apoptóticas es muy escaso, siendo indetectable en la mayor parte de las muestras (media \pm DS = $4,8 \pm 3,8$).

2.2. Apoptosis espontánea *in vitro*

Se determinó en 50 muestras a las 24 horas y en 34 muestras a las 48 horas. La media (\pm D.S.) de la apoptosis espontánea a las 24 horas ($36,1 \pm 18,8$) y a las 48 horas ($38,5 \pm 19,2$) fue significativamente superior a los valores de apoptosis *ex vivo* ($p < 0,05$ en ambas situaciones). Cuando se comparó la apoptosis espontánea a las 24 horas con la de las 48 horas, los valores que se obtuvieron no alcanzaron significado estadístico.

Los siete pacientes que estaban recibiendo tratamiento durante la realización del estudio *in vitro*, no presentaron porcentajes de apoptosis espontánea diferentes al resto.

2.3. Inducción de apoptosis por fármacos

a) Inducción de apoptosis *in vitro* por clorambucil

La media (\pm DS) de la apoptosis inducida por clorambucil a las 24 horas ($55,3 \pm 27,9$) fue superior de manera significativa a la apoptosis espontánea a las 24 horas ($p < 0,05$).

A las 48 horas la muerte celular fue significativamente superior con clorambucil ($60,6 \pm 22,8$) que de manera espontánea en el mismo periodo de incubación ($p < 0,05$). Cuando se comparó la apoptosis inducida por este fármaco en los dos periodos de tiempo no se observaron diferencias.

b) Inducción de apoptosis *in vitro* por fludarabina

La media (\pm DS) de la apoptosis inducida por fludarabina a las 24 horas ($46,8 \pm 20,1$) fue superior de manera significativa a la apoptosis espontánea a las 24 horas ($p < 0,05$).

A las 48 horas la muerte celular fue significativamente superior con fludarabina ($69,3 \pm 17,1$) que de manera espontánea en el mismo periodo de incubación ($p < 0,05$). Cuando se comparó la apoptosis inducida por este fármaco en los dos

periodos de tiempo se observó un significativo aumento de la apoptosis en el segundo día de incubación ($p < 0.05$).

c) *Inducción de apoptosis in vitro por 2-clorodeoxiadenosina*

La media (\pm DS) de la apoptosis inducida por 2-CdA a las 24 horas ($49,3 \pm 19,5$) fue superior de manera significativa a la apoptosis espontánea a las 24 horas ($p < 0,05$).

A las 48 horas la muerte celular fue significativamente superior con 2-CdA ($65,7 \pm 18,0$) que de manera espontánea en el mismo periodo de incubación ($p < 0,05$). Cuando se comparó la apoptosis inducida por este fármaco en los dos periodos de tiempo se observó un significativo aumento de la apoptosis en el segundo día de incubación ($p < 0,05$).

A continuación exponemos las respuestas inducidas por los fármacos *in vitro*, cuantificadas como índices de apoptosis. Esto nos permite comparar de manera más eficaz el rendimiento de los fármacos *in vitro* en los dos periodos de tiempo y entre los diferentes fármacos, puesto que el índice lleva implícito el aumento de apoptosis atribuible al fármaco en cada paciente. En la Tabla 10 se exponen los índices de apoptosis de clorambucil, fludarabina y 2-clorodeoxiadenosina a las 24 y 48 horas de incubación *in vitro*.

Tabla 10. Índices de apoptosis in vitro inducida por fármacos tras 24 y 48 horas de incubación

Paciente	Índice de apoptosis por Clorambucil		Índice de apoptosis por Fludarabina		Índice de apoptosis por 2-clorodeoxiadenosina	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
1. NAP	1,2	1,2	1,0	1,2	1,1	1,2
2. LBG	1,0		1,9		2,1	
3. JBC	2,9	2,5	1,3	2,1	1,2	1,5
4. JBS	2,6	3,5	1,2	3,1	1,3	2,0
5. MBM	3,1	3,1	1,5	1,5	1,3	1,3
6. JCM	1,3		1,3		1,5	
7. ACC	2,9	2,3	1,4	2,2	1,5	1,3
8. JCD	1,5	2,1	1,0	1,0	1,1	1,2
9. ACF	1,0	1,2	1,5	3,9	2,0	3,9
10. PCA	2,6	3,2	1,5	4,0	2,5	3,6
11. ACS	1,7	1,7	1,0	1,0	1,2	1,2
12. SCT	1,2	1,2	1,3	2,0	1,4	1,9
13. CDC	1,2	1,3	1,1	1,3	1,4	1,2
14. MFZ	1,3	2,1	1,3	2,7	1,3	2,2
15. MFF	1,4	1,6	1,7	2,4	2,0	2,5
16. FFN	1,1	1,6	1,7	3,4	1,5	3,3
17. MGG	1,2	1,2	1,3	1,2	1,3	1,2
18. AGG	1,0	1,0	1,1	1,4	1,2	1,2
19. BGT	2,5		1,5		1,6	
20. HGN	1,3	2,0	1,0	1,8	1,0	2,0
21. FGA	1,0	1,0	1,0	1,1	1,0	1,1
22. EHM	1,4	1,6	1,3	1,9	1,4	1,7
23. FIE	1,5		1,2		1,2	
24. PJJ	1,8	2,5	2,1	3,3	2,7	3,6
25. MLP	1,7	2,2	1,1	2,2	1,0	1,8
26. MLE	1,1	1,0	1,2	1,6	1,8	1,4
27. JLS	1,0	2,0	1,5	1,6	1,4	1,8
28. CMA	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
29. TMG	1,4	1,7	1,0	1,1	1,2	1,4
30. TMJ	1,1	1,2	1,6	2,7	1,4	2,3
31. FMR	1,2	1,4	1,5	2,1	1,3	1,8
32. MMR	1,2		1,2		1,1	
33. MMM	1,6		1,6		1,6	
34. AMG	1,6		1,4		1,3	
35. IMP	1,1	1,2	1,1	1,2	1,3	1,3
36. PMP	1,0		1,0		1,0	
37. JPV	3,1	3,2	1,4	1,4	1,6	1,6
38. MPC	1,0		1,0		1,0	
39. CPP	2,9		2,3		2,1	
40. APP	3,2		1,9		1,8	

Tabla 10 (cont.). Índices de apoptosis *in vitro* inducida por fármacos tras 24 y 48 horas de incubación

Paciente	Índice de apoptosis por Clorambucil		Índice de apoptosis por Fludarabina		Índice de apoptosis por 2-clorodeoxiadenosina	
	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
41. JRJ	1,1	1,3	1,3	2,6	1,5	2,4
42. IRG	1,3	1,5	1,7	2,0	1,3	1,8
43. JRL	1,2		1,2		1,3	
44. FSP	1,3	1,4	1,3	2,2	1,8	2,3
45. ESM	1,9		1,3		1,1	
46. ASR	2,6		1,6		1,9	
47. CTH	3,2		1,9		2,1	
48. TVT	1,1		2,5		4,0	
49. RVP	1,2	1,4	1,4	1,5	1,5	1,5
50. SYF	2,2	1,3	2,0	1,4	1,8	2,0
<i>n</i>	50	34	50	34	50	34
<i>Media</i>	1,6	1,8	1,4	2,0	1,5	1,9
<i>D. S.</i>	0,7	0,7	0,3	0,8	0,5	0,8
<i>Min</i>	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
<i>Max</i>	3,2	3,5	2,5	4,0	4,0	3,9

Tabla 10. Índice de apoptosis inducida por fármacos *in vitro* tras 24 y 48 horas de incubación. Se representan los índices de apoptosis *in vitro* obtenidos como una relación entre la apoptosis inducida por los fármacos (clorambucil, fludarabina y 2-clorodeoxiadenosina) y la apoptosis espontánea, tras 24 horas (50 muestras) y 48 horas (34 muestras) de incubación. En la tabla aparecen los valores de la media aritmética, desviación estándar (D.S.), valor mínimo y máximo de los índices de respuesta *in vitro* con cada uno de los fármacos ensayados.

2.4. Índices de apoptosis inducida por clorambucil a las 24 y 48 horas

Las medias (\pm DS) de los valores que se obtuvieron en ambos periodos de incubación no mostraron diferencias significativas ($1,6 \pm 0,7$ vs $1,8 \pm 0,7$)

2.5. Índices de apoptosis inducida por análogos de purina a las 24 y 48 horas

Las medias (\pm DS) de los valores que se obtuvieron con fludarabina en ambos periodos de incubación mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$), siendo más altos los valores en el segundo día de incubación ($1,4 \pm 0,3$ vs $2,0 \pm 0,8$). Lo mismo ocurrió con 2-CdA ($1,5 \pm 0,5$ vs $1,9 \pm 0,8$).

Los índices de apoptosis con los dos análogos de purina tanto a las 24 como a las 48 horas, mostraron un coeficiente de correlación muy elevado ($r = 0,89$), por lo que en adelante sólo haremos referencia al índice con fludarabina. Esto tiene especial interés dado que sólo un paciente fue tratado con 2-CdA.

2.6. Comparación de los índices de apoptosis inducida por clorambucil con los de fludarabina a las 24 y 48 horas.

La media (\pm DS) de los índices de apoptosis inducida por clorambucil comparada con la de fludarabina a las 24 horas de incubación no mostró diferencias ($1,6 \pm 0,7$ vs $1,4 \pm 0,3$). A las 48 horas tampoco se observaron diferencias entre ambos fármacos ($1,8 \pm 0,7$ vs $2,0 \pm 0,8$).

2.7. Influencia del tratamiento previo y/o durante la realización del ensayo *in vitro*

Se compararon los índices de apoptosis *in vitro* inducida por fármacos entre los pacientes que habían recibido tratamiento previo al ensayo *in vitro* (8 pacientes), -se excluyeron los 2 que además lo recibieron en la fecha del estudio-, con los que lo recibieron posteriormente o nunca lo recibieron (35 pacientes), observándose un índice significativamente más bajo con fludarabina a 24 horas ($p < 0,05$), así como la misma tendencia con fludarabina a 48 horas, en el grupo de pacientes pre-tratados. No se observaron diferencias en los índices de apoptosis por clorambucil.

Cuando se consideraron los pacientes que habían recibido previamente o estaban recibiendo tratamiento (15 pacientes) en el momento del ensayo, frente a los que

recibieron tratamiento posteriormente o nunca lo recibieron (35 pacientes), volvieron a existir diferencias significativas en los índices de fludarabina a las 48 horas ($p < 0,05$). Tampoco se observaron diferencias con los índices de apoptosis inducida por clorambucil.

Los pacientes que estaban recibiendo tratamiento en el momento del estudio *in vitro* (5 pacientes), -se excluyeron los 2 que además lo recibieron previo a la fecha del estudio-, no tuvieron un comportamiento diferente en los índices de apoptosis con ninguno de los dos fármacos, al grupo de los pacientes que no habían experimentado contacto con el fármaco en dicho momento (35 pacientes).

En la figura 2 se exponen unos ejemplos representativos de pacientes con y sin respuesta *in vitro* a clorambucil y fludarabina.

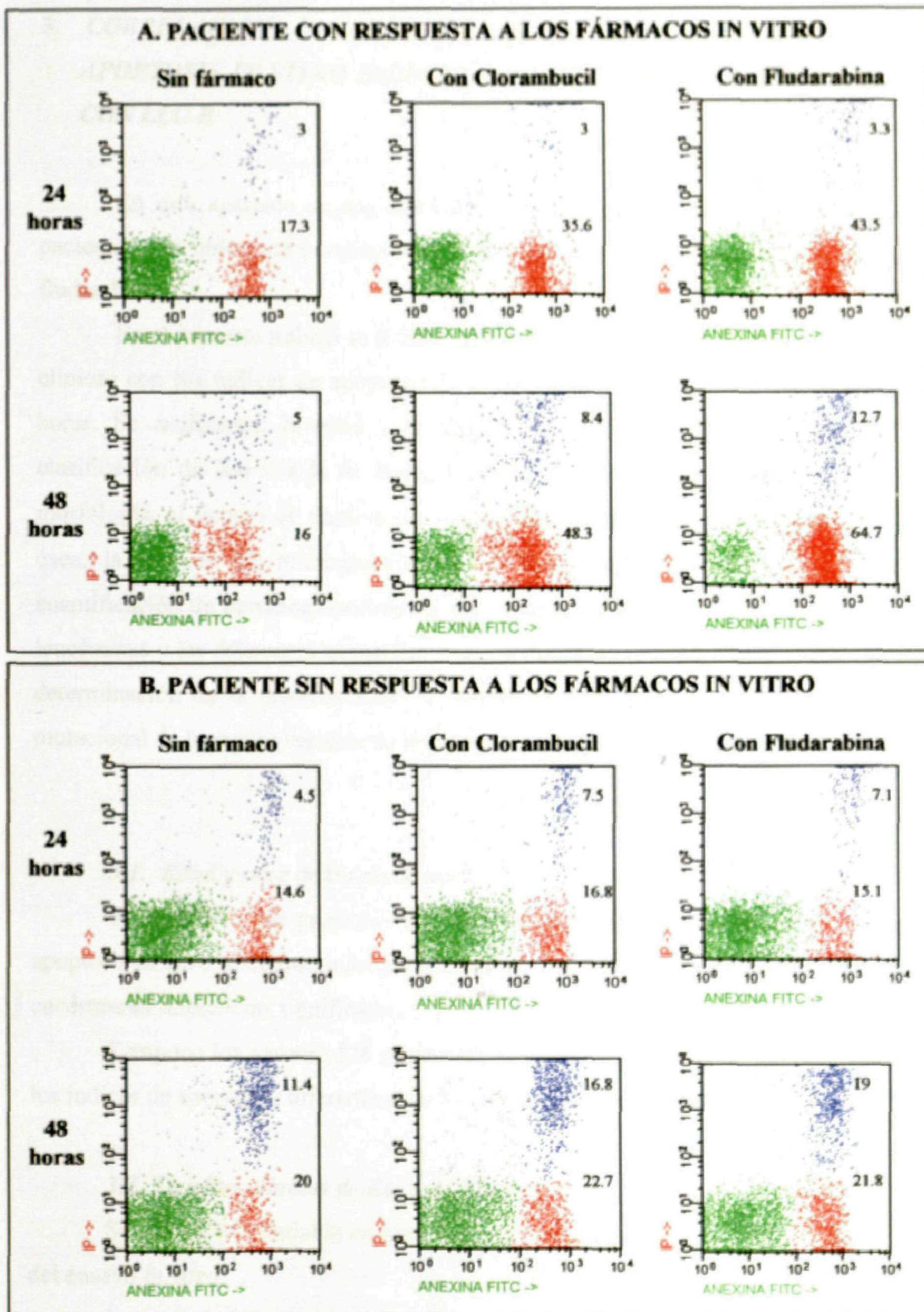


Figura 2. Diagramas de fluorescencias de pacientes representativos con respuesta (A) y sin respuesta (B) al tratamiento in vitro. En las columnas se muestran los diagramas correspondientes a los LB de los pacientes en cultivo en ausencia de fármaco y en presencia de clorambucil o fludarabina, tanto tras 24 como 48 horas de cultivo (en filas). Dentro de cada diagrama se indican los porcentajes de apoptosis temprana (en rojo) y apoptosis tardía (en azul).

3. CORRELACION ENTRE LAS CARACTERISTICAS CLINICAS Y LA APOPTOSIS *IN VITRO* INDUCIDA POR FÁRMACOS EN LOS PACIENTES CON LLC-B

En este apartado se analizaron una serie de características clínicas de los 50 pacientes con objeto de correlacionarlas con los índices de apoptosis a clorambucil y fludarabina.

En el presente trabajo se realizó un estudio de correlación de diferentes variables clínicas con los índices de apoptosis de clorambucil y fludarabina a las 24 y a las 48 horas. Se analizaron: la edad y el sexo de los pacientes, el estadio referido a la clasificación de Rai y a la de Binet, la cifra de linfocitos en sangre periférica y su morfología, el tiempo de duplicación linfocitaria, el patrón de afectación de la médula ósea, la tasa de $\beta 2$ microglobulina y de láctico dehidrogenasa sérica (LDH), la cuantificación de inmunoglobulinas, el porcentaje de expresión de CD38 en las células leucémicas y las diferentes anomalías cromosómicas. En tres pacientes se dispuso de la determinación de la proteína ZAP-70. No se dispuso de la determinación del estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgVh).

3.1. Edad y sexo de los pacientes

Se analizó si los pacientes con edad <60 años (13 pacientes) tenían índices de apoptosis *in vitro* diferentes a los pacientes con edad >60 años (37 pacientes), sin que se encontraran diferencias significativas.

Tampoco los varones (28 pacientes) tuvieron un comportamiento con respecto a los índices de apoptosis, diferente al de las mujeres (22 pacientes).

3.2. Estadios clínicos de Rai y de Binet

Se valoró esta variable en dos momentos diferentes, al diagnóstico y en la fecha del ensayo *in vitro*.

Se analizó si los pacientes clasificados según los estadios de Rai en el momento del diagnóstico: 0 (26 pacientes), I-II (23 pacientes) y III-IV (1 paciente), tuvieron índices de apoptosis diferentes. No se encontraron diferencias significativas en los valores en ninguno de los dos fármacos en los dos periodos de tiempo. En cambio, cuando se analizaron los diferentes estadios en la fecha de realización del ensayo *in*

vitro: 0 (14 pacientes), I-II (31 pacientes) y III-IV (5 pacientes), el índice de apoptosis con clorambucil a las 24 horas fue significativamente superior en el estadio 0 que en el estadio I-II ($p<0,05$); con fludarabina a las 48 horas de incubación alcanzó valor estadístico cuando se comparó el estadio III-IV con el 0 ($p<0,05$) y se acercó a la significación estadística cuando se comparó el III-IV con el I-II ($p=0,07$); en ambas situaciones los índices más bajos correspondían al estadio clínico más avanzado.

Se analizó igualmente si los pacientes clasificados según los estadios de Binet en el momento del diagnóstico: A (38 pacientes), B (11 pacientes) y C (1 paciente), mostraron diferencias en los índices de apoptosis *in vitro*, sin encontrar valores significativos. Sin embargo, el análisis de esta misma variable en la fecha del ensayo *in vitro* A (33 pacientes), B (11 pacientes) y C (6 pacientes) mostró que el índice de apoptosis con clorambucil a las 24 horas fue significativamente mayor en el estadio A que en el B ($p<0,05$) y se aproximó a la significación estadística a las 48 horas ($p=0,07$). Con fludarabina la muerte celular fue igualmente superior en el estadio A que en el C ($p<0,05$).

3.3. Número absoluto de linfocitos en sangre periférica

Se dividieron los pacientes en aquellos que tenían una cifra de linfocitos por encima de $50.000/\text{mm}^3$ (37 pacientes) y los que tenían una cifra por debajo de $50.000/\text{mm}^3$ (13 pacientes). Cuando se correlacionaron ambos grupos con los índices de apoptosis *in vitro*, el índice de fludarabina a las 48 horas fue menor en los pacientes que tenían mayor linfocitosis, pero sólo cuando se excluyeron dos casos con valores extremos alcanzó significación estadística ($p<0,05$).

3.4. Tiempo de duplicación linfocitaria (TDL)

Los pacientes fueron divididos en dos grupos, aquellos que tenían $\text{TDL}>12$ meses (34 pacientes) y los que tenían $\text{TDL}<12$ meses (7 pacientes). Sólo el índice de apoptosis inducida por fludarabina a las 24 horas fue diferente, siendo mayor en el grupo que tuvo $\text{TDL}>12$ meses ($p<0,05$).

3.5. Morfología de los linfocitos en sangre periférica

Se analizaron dos grupos, aquellos que tenían una morfología típica (21 pacientes) y los que tenían una morfología atípica (24 pacientes), considerando en este último grupo los que tenían un elevado porcentaje de prolinfocitos y aquellos con

linfocitos atípicos; no encontrándose diferencias en los índices de muerte celular con ninguno de los dos fármacos.

3.6. Patrón morfológico de la médula ósea

Había 5 pacientes con afectación medular difusa y 23 pacientes sin patrón difuso (intersticial, nodular o mixto). Cuando se analizaron ambos grupos con respecto a los índices de apoptosis inducida por fármacos, el único resultado con poder estadístico fue el de la apoptosis por clorambucil a las 48 horas, donde inesperadamente el índice fue mayor en los pacientes con afectación difusa ($p < 0,05$).

3.7. Niveles de $\beta 2$ microglobulina

Se establecieron dos grupos de pacientes según tuvieran valores por encima de 3,5 mg/ml (8 pacientes) e inferiores a 3,5 mg/ml (20 pacientes). Los índices de apoptosis inducida por clorambucil a las 48 horas y el de fludarabina en ambos periodos de incubación (excluyendo un valor extremo a las 48 horas con fludarabina) fueron significativamente menores en los pacientes con una tasa más elevada de $\beta 2$ microglobulina ($p < 0,05$).

3.8. Niveles de láctico dehidrogenasa sérica (LDH)

Los pacientes que tuvieron cifras de LDH > 460 U/l (6 pacientes) no tuvieron un comportamiento diferente en la apoptosis inducida por fármacos comparados con los que tenían cifras de LDH < 460 U/l (38 pacientes).

3.9. Niveles de Inmunoglobulinas séricas

Se agruparon los pacientes según las cifras de inmunoglobulinas séricas (mg/dl):

IgG: > 1300 (4 pacientes), 600-1300 (27 pacientes), < 500 (13 pacientes)

IgA: > 300 (3 pacientes), 70-300 (24 pacientes), < 70 (17 pacientes)

IgM: > 350 (0 pacientes), 50-350 (16 pacientes), < 50 (28 pacientes)

En ninguno de los grupos se observaron diferencias significativas en relación con los índices de apoptosis por quimioterápicos.

3.10. Expresión del antígeno CD38 en los linfocitos de sangre periférica

Se establecieron dos niveles de corte según el porcentaje de células leucémicas que expresaban CD38: 30% (6 pacientes $> 30\%$ y 26 pacientes $< 30\%$) y 7% (10

pacientes > 7% y 22 pacientes < 7%). Cuando se analizaron los índices de apoptosis *in vitro*, sólo se apreció que los valores con fludarabina a las 24 horas fueron significativamente mayores en el grupo que expresaba el antígeno < 30 %, frente al que lo expresaba > 30% ($p<0,05$).

3.11. Expresión de la proteína ZAP-70

Se determinó sólo en tres pacientes y con un punto de corte del 20% de células que la expresaban no se encontró correlación entre los niveles de proteína y los índices de apoptosis *in vitro* con ninguno de los dos fármacos.

3.12. Alteraciones cromosómicas

A) ALTERACIONES DETECTADAS POR FISH

Se estudiaron las siguientes mutaciones: del 6q, del 13q, del 11q, del p53, monosomía 18 y trisomía 12; teniendo en cuenta en cada una de ellas si era un hallazgo aislado o asociado con otras mutaciones. Se compararon con el resto de los pacientes que carecían de la alteración.

- **Delección 6q.** Sólo 2 pacientes tenían esta alteración, uno de ellos como mutación aislada. Ambos pacientes tenían índices de apoptosis *in vitro* inducida por clorambucil más elevados que el resto en ambos periodos de tiempo ($p<0,05$).
- **Delección 13q.** Se observó en 16 pacientes (12 aislada y 4 asociada); cuando se consideraron los 16 pacientes juntos, sólo se observó que éstos tenían, inesperadamente, índices de apoptosis inducida por clorambucil más bajos a las 48 horas ($p<0,05$). Considerando sólo los 12 pacientes con la mutación aislada, nuevamente se observaron índices más bajos de apoptosis por clorambucil en los dos periodos de tiempo ($p<0,05$).
- **Delección 11q.** Estaba presente en 4 pacientes (2 como mutación aislada y 2 asociada a otras). Estas 4 muestras no tuvieron un comportamiento diferente al resto, en la apoptosis inducida por fármacos.
- **Delección p53.** La presentaron 8 pacientes (4 como alteración aislada y 4 combinada). Cuando se analizaron los 8 pacientes, se observó un menor índice de apoptosis inducida por fludarabina a las 24 horas que en los

pacientes que no tenían la mutación ($p<0,05$). No hubo diferencias en el resto de los análisis.

- **Monosomía 18.** Sólo 4 pacientes la presentaron, 1 como alteración única y su comportamiento en relación con la apoptosis *in vitro* no fue diferente al resto.
- **Trisomía 12.** Se encontró presente en 11 pacientes (5 aislada y 6 asociada a otras alteraciones). Tanto cuando se consideraron los pacientes que tenían la alteración aislada como el grupo completo, no se encontró un diferente comportamiento en cuanto a la muerte celular inducida por fármacos *in vitro* con respecto al resto de los enfermos.

B) ALTERACIONES EN EL CARIOTIPO

Se dividieron los pacientes en tres grupos: cariotipo normal (24 muestras), cariotipo anormal con una o dos alteraciones (14 muestras) y cariotipo complejo con tres o más alteraciones (8 muestras). Con respecto a la apoptosis inducida por clorambucil, no se apreciaron diferencias en ninguna de las comparaciones. Cuando se consideraron los resultados de la apoptosis *in vitro* inducida por fludarabina, los pacientes con cariotipo complejo respondieron peor *in vitro* que los pacientes con cariotipo normal a las 24 y 48 horas de incubación ($p<0,05$) y en el límite de la significación estadística cuando se compararon los pacientes con cariotipo complejo y cariotipo anormal en ambos periodos de incubación ($p=0,06$ y $p=0,07$; respectivamente); en cambio no hubo diferencias de comportamiento *in vitro* entre los pacientes con cariotipo normal y anormal. Por último, los pacientes con cariotipo complejo tuvieron índices de apoptosis más bajos que el grupo conjunto de los que tenían cariotipo normal y anormal cuando se analizó la muerte celular *in vitro* inducida por fludarabina en 24 y 48 horas ($p<0,05$).

4. CORRELACION ENTRE LA RESPUESTA CLÍNICA AL TRATAMIENTO Y LA APOPTOSIS *IN VITRO* INDUCIDA POR FÁRMACOS EN LOS PACIENTES CON LLC-B

Se recogió la respuesta clínica al tratamiento con agentes del Grupo Alquilante (GA) (clorambucil, clorambucil/ciclofosfamida más prednisona y ciclofosfamida más prednisona más vincristina) y con agentes del Grupo Análogos de Purina (GP) (fludarabina/2-CdA, fludarabina más ciclofosfamida y fludarabina más ciclofosfamida más mitoxantrona). Estos resultados han sido expuestos con detalle en la Tabla 7 y Tabla 8. Se definió como Respuesta clínica (R) a la que se obtenía en los pacientes que presentaban Respuesta Completa (RC) o Respuesta Parcial (RP) y como No Respuesta clínica (NR) la que se obtenía en los pacientes que presentaban Enfermedad Estable (EE) o Enfermedad Progresiva (EP). Cuando un mismo paciente fue tratado en dos periodos diferentes con fármacos del mismo grupo (GA o GP), lo que ocurrió sólo con el grupo GA, si las respuestas clínicas fueron iguales se consideró, lógicamente una sola respuesta (R o NR); pero si las respuestas fueron diferentes, se seleccionó la que se consiguió en el episodio terapéutico más cercano a la fecha del estudio *in vitro*: tuvo prioridad el episodio terapéutico que coincidía con la fecha del estudio *in vitro* y el más cercano a la fecha del mismo si ambos fueron previos o ambos fueron posteriores. Si un paciente recibió tratamiento previo y posterior con un mismo grupo terapéutico, a la fecha del estudio *in vitro* con respuesta clínica discordante, se eligió obviamente la respuesta que se obtuvo en el periodo posterior al test *in vitro*. Cuando se analizaron con detalle los periodos terapéuticos y las respuestas de los pacientes, se comprobó que cada paciente que recibió más de un intento terapéutico del mismo grupo tuvo el mismo tipo de respuesta (R o NR), excepto el paciente número 7 que recibió tres intentos terapéuticos con fármacos del GA antes de la realización del test *in vitro*, el primero con respuesta (R) y los dos siguientes sin respuesta (NR): consecuentemente el resultado que se valoró fue NR. Estos resultados quedan expuestos en la Tabla 8.

Asimismo se recogieron los resultados del índice de apoptosis *in vitro* inducido por clorambucil, fludarabina y 2-CdA a las 24 y 48 horas. Dado que la correlación entre los valores que se obtuvieron con ambos análogos de purina fue muy alta y que nuestros pacientes fueron tratados con fludarabina y sólo en una ocasión con 2-CdA (paciente número 4, en el que además no pudo evaluarse la respuesta), sólo se evaluaron los resultados de apoptosis *in vitro* con fludarabina. Estos resultados han sido expuestos con

detalle en la Tabla 10. El índice de apoptosis se definió como el cociente del porcentaje de apoptosis inducida por fármacos y el porcentaje de apoptosis espontánea. Un índice de 1.0 significa falta de respuesta absoluta *in vitro*.

Se intentó demostrar si el tipo de respuesta clínica al tratamiento con agentes del GA correlacionó con los resultados de la apoptosis *in vitro* inducida por clorambucil a las 24 y 48 horas. Como complemento de este apartado, se analizó si la respuesta clínica al clorambucil administrado como fármaco aislado (sin prednisona) se correlacionó con los resultados de la apoptosis *in vitro* inducida por clorambucil. Por otra parte, se intentó correlacionar la respuesta clínica al tratamiento con agentes del GP con los resultados de la apoptosis *in vitro* inducida por fludarabina a las 24 y 48 horas. Además se investigó si la respuesta clínica a la fludarabina administrada como fármaco aislado se correlacionó con los resultados de la apoptosis *in vitro* inducida por fludarabina. Se llevó a cabo el estudio con clorambucil o fludarabina administrados de forma aislada porque, como ya se ha referido, el porcentaje de respuestas clínicas es algo menor que cuando se asocia a otros fármacos.

La relación de los pacientes que recibieron tratamiento, las respuestas clínicas y los índices de apoptosis *in vitro* por clorambucil y fludarabina, quedan expuestos en la Tabla 11.

Por último, intentamos aclarar si la correlación *in vivo/in vitro* es diferente entre el grupo de pacientes que recibieron agentes del GA antes del ensayo *in vitro* y aquellos que recibieron fármacos del mismo grupo después del mismo. No planteamos la misma cuestión con agentes del GP, dado que ningún paciente había recibido análogos de purina previamente.

Tabla 11. Pacientes que han recibido tratamiento farmacológico, las respuestas clínicas y los índices de apoptosis in vitro inducida tras 24 y 48 horas de incubación

Paciente	Tratamiento	Respuesta	Tratamiento	Respuesta	Fecha	Inducción de apoptosis por Clorambucil		Inducción de apoptosis por Fludarabina	
						24 horas	48 horas	24 horas	48 horas
1. NAP	GA	R			pr	1,2	1,2	1,0	1,2
4. JBS	GA	NR	GP	NE	pt	2,6	3,5	1,2	3,1
5. MBM	GA	NR			pt	3,1	3,1	1,5	1,5
6. JCM	GA	NR	GP	R	cc - pt	1,3		1,3	
7. ACC	GA	NR			pr	2,9	2,3	1,4	2,2
8. JCD	GA	NR	GP	NR	cc pt	1,5	2,1	1,0	1,0
13. CDC	GA	R			pt	1,2	1,3	1,1	1,3
14. MFZ			GP	R	pt	1,3	2,1	1,3	2,7
18. AGG	GA	R			pr - pt	1,0	1,0	1,1	1,4
20. HGN			GP	R	pt	1,3	2,0	1,0	1,8
22. EHM			GP	R	pt	1,4	1,6	1,3	1,9
23. FIE	GA	R	GP	R	cc - pt	1,5		1,2	
25. MLP			GP	R	pt	1,7	2,2	1,1	2,2
26. MLE	GA	NR			pr	1,1	1,0	1,2	1,6
27. JLS	GA	NR			pr	1,0	2,0	1,5	1,6
28. CMA	GA	R	GP	R	pr - pt	1,0	1,0	1,0	1,0
29. TMG	GA	NR	GP	NR	pr	1,4	1,7	1,0	1,1
30. TMJ			GP	R	pt	1,1	1,2	1,6	2,7
33. MMM	GA	NR			pr - cc	1,6		1,6	
34. AMG			GP	R	pt	1,6		1,4	
35. IMP			GP	R	pt	1,1	1,2	1,1	1,2
36. PMP	GA	NR	GP	R	cc - pt	1,0		1,0	
38. MPC	GA	NR	GP	R	pt	1,0		1,0	
40. APP	GA	R			pt	3,2		1,9	
41. JRJ			GP	R	pt	1,1	1,3	1,3	2,6
44. FSP	GA	R	GP	R	pr - pt	1,3	1,4	1,3	2,2
45. ESM			GP	R	pt	1,9		1,3	
47. CTH	GA	R			cc - pt	3,2		1,9	
48. TVT	GA	NR			pr - cc	1,1		2,5	
50. SYF	GA	R			pt	2,2	1,3	2,0	1,4

Tabla 11. Índices de apoptosis in vitro inducida por fármacos y la respuesta clínica al tratamiento de los pacientes de LLC-B. Se representan los índices de apoptosis in vitro inducida por clorambucil y fludarabina tras 24 y 48 horas de incubación y las respuesta clínica que presentaron esos pacientes al tratamiento recibido. Los pacientes pudieron recibir tratamiento de uno de los grupos terapéuticos o de ambos. Tratamiento. GA: grupo alquilantes, GP: grupo análogos de purina. Respuesta. R: respuesta, NR: no respuesta, NE: no evaluable. Fecha en que recibieron el tratamiento con respecto a la realización del ensayo in vitro. pr: previo, cc: concomitante, pt: posterior.

4.1. Correlación de la respuesta clínica a agentes del GA con los índices de apoptosis *in vitro* con clorambucil a 24 y 48 horas

El tipo de respuesta clínica a agentes del GA no guardó relación significativa con los valores de apoptosis *in vitro* inducida por clorambucil ni a las 24 ni a las 48 horas. En la Figura 3 se representa la comparación de los índices de apoptosis por clorambucil a las 24 horas de incubación y el tipo de respuesta clínica a agentes del GA que presentaron los pacientes.

Cuando se seleccionaron de este grupo los pacientes tratados sólo con clorambucil, excluyendo los que recibieron clorambucil y prednisona con o sin vincristina, tampoco se observó correlación entre la respuesta clínica y el índice de muerte celular *in vitro* inducida por clorambucil en los dos periodos de tiempo.

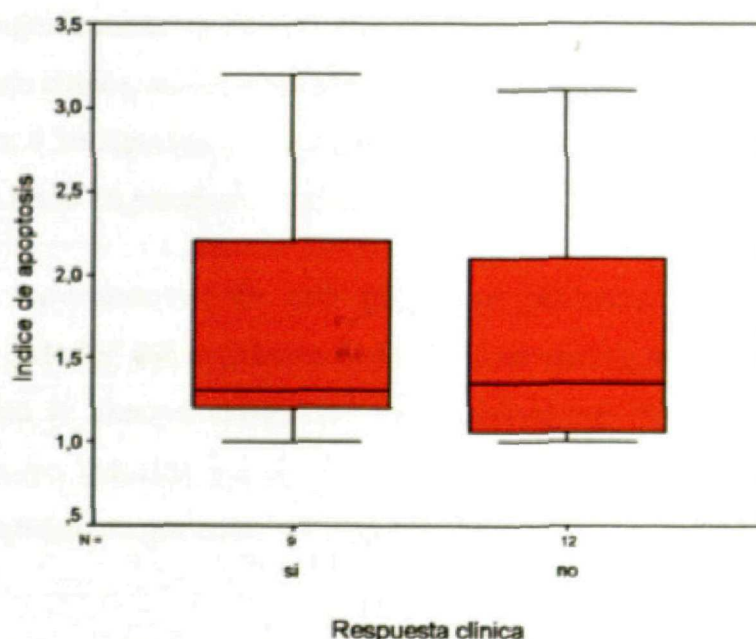


Figura 3. Correlación de la respuesta clínica a agentes del GA con los índices de apoptosis *in vitro* con clorambucil a 24 horas. No se observó relación entre el índice de apoptosis *in vitro* por clorambucil y el tipo de respuesta clínica que presentaron los pacientes al tratamiento con agentes del AG.

4.2. Correlación de la respuesta clínica a agentes del GP con los índices de apoptosis *in vitro* con fludarabina a 24 y 48 horas

El tipo de respuesta clínica a agentes del GP no guardó relación significativa con los valores de apoptosis *in vitro* inducida por fludarabina a las 24 horas. Sin embargo, tras 48 horas de incubación con el fármaco, los resultados muestran diferencias en el límite de la significación estadística ($p=0,06$). De los 11 pacientes que fueron tratados con agentes del GP, 9 presentaron respuesta clínica (R) y 2 no respondieron (NR). Del grupo de los 9 que respondieron clínicamente, 7 presentaron índices de apoptosis *in vitro* inducida por fludarabina por encima de 1,7 y los 2 restantes tuvieron índices de apoptosis de 1,2 y 1,0. Analizando los datos del paciente con índice de apoptosis 1,0 (paciente número 28), se observó que el porcentaje de linfocitos que sufrían apoptosis espontánea era muy elevado y coincidía con el valor máximo de todos los pacientes estudiados (85% y 87% a las 24 y 48 horas, respectivamente), por lo que era esperable una escasa inducción de muerte celular por los fármacos; de hecho, los índices de apoptosis tanto con clorambucil como con fludarabina en los dos periodos estudiados fue de 1,0. Si este paciente es excluido del análisis, la comparación alcanza diferencias estadísticamente significativas ($p<0,05$). En cuanto a los dos pacientes que no presentaron respuesta clínica, ambos presentaron índices de apoptosis de 1,0 y 1,1.

En la Figura 4 se representa la comparación de los índices de apoptosis de los linfocitos B tras 48 horas en presencia de fludarabina.

Cuando se seleccionaron de este grupo los pacientes tratados sólo con fludarabina, excluyendo los que recibieron fludarabina asociada a ciclofosfamida con o sin mitoxantrona, no se observó correlación entre la respuesta clínica y el índice de muerte celular *in vitro* inducida por fludarabina en ninguno de los dos periodos de tiempo, aunque el número de pacientes fue muy bajo (4 pacientes a las 48 horas).

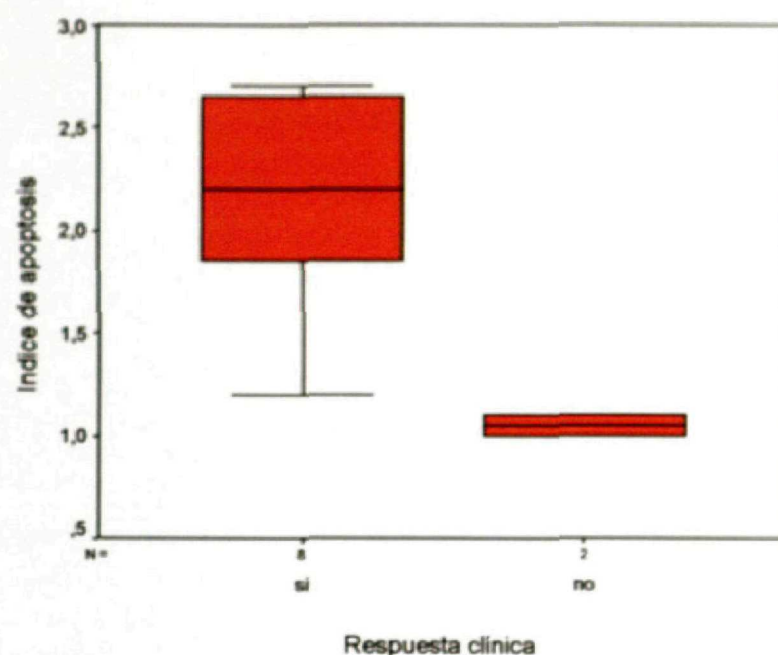


Figura 4. Correlación de la respuesta clínica a agentes del GP con los índices de apoptosis *in vitro* con fludarabina a las 48 horas de incubación. El paciente número 28 quedó excluido del estudio tras considerar que su falta de respuesta *in vitro* a los fármacos era debida a su elevado porcentaje de apoptosis espontánea.

4.3. Influencia del tratamiento previo o concomitante en la correlación *in vivo/in vitro*

Dada la incertidumbre sobre el efecto que pudiera tener el tratamiento previo o concomitante con la correlación *in vivo/in vitro*, se intentó analizar sólo los pacientes que fueron tratados posteriormente a la realización del test *in vitro* (15 pacientes). En los que recibieron clorambucil sólo posteriormente (6 pacientes), volvió a no encontrarse ningún tipo de correlación y en los que recibieron fludarabina (10 pacientes), como todos tuvieron respuesta clínica, no pudo establecerse la comparación; si bien 9 pacientes tuvieron índices de apoptosis $\geq 1,3$.

DISCUSIÓN

La leucemia linfocítica crónica B (LLC-B) se caracteriza por el acumulo de linfocitos B neoplásicos de aspecto maduro, funcionalmente inactivos. Son células detenidas en fase G₀ y su exceso clonal está causado por defectos presentes en los mecanismos de apoptosis, muerte celular programada, más que por alteraciones en la regulación del ciclo celular (Rozman C, 1995). Los pacientes con LLC-B en estadios clínicos iniciales (Binet A ó Rai 0) no deben ser tratados, a menos que la enfermedad progrese. En contraste, la mayoría de los pacientes sintomáticos por la enfermedad o con factores de mal pronóstico requieren tratamiento (Cheson BD, 1996).

A pesar de los progresos realizados en el manejo de estos pacientes, este continua siendo insatisfactorio. Durante muchos años el clorambucil, sólo o combinado con esteroides, ha sido el tratamiento de elección y el responsable de respuestas clínicas, habitualmente parciales, en el 40-60% de los enfermos (Rozman C, 1995; Montserrat E, 1997). La aparición de los análogos de purina, sobre todo la fludarabina, supuso un avance en la terapia de la enfermedad, consiguiéndose en pacientes no tratados previamente respuestas de hasta el 80%, algunas veces completas sin enfermedad residual mínima (Keating MJ, 1993; Keating MJ, 1998; Clavic M, 1998); sin embargo, las respuestas son transitorias, todos los pacientes recaen eventualmente y la supervivencia no se ha conseguido prolongar (Rai KR, 2000; Leporrier M, 2001). Por otra parte, las respuestas a fludarabina de los pacientes que han recaído o son resistentes a agentes alquilantes es mucho más baja (Sorensen JM, 1997). Por ello se han buscado nuevas estrategias de combinación de fármacos quimioterápicos, como fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrona (Bosch F, 2002), la asociación de quimioterapia y anticuerpos monoclonales, como fludarabina, ciclofosfamida y rituximab (Keating MJ, 2003) y en los últimos años el trasplante de progenitores hematopoyéticos (Ridgen M, 2003). Estos nuevos enfoques terapéuticos han demostrado una mayor eficacia en el porcentaje y en la calidad de las respuestas, con frecuencia consiguen remisión molecular, pero todavía no está claro su impacto en la supervivencia.

El panorama expuesto, los efectos secundarios de los tratamientos enumerados y el tipo de población enferma, habitualmente ancianos con otras patologías, mantiene todavía el interés práctico por los fármacos iniciales: la fludarabina y el clorambucil con o sin esteroides.

El mecanismo de acción del clorambucil y de los análogos de purina, fludarabina y 2-clorodeoxiadenosina, es complejo incluyendo la inducción de apoptosis (Begleiter A, 1994; Zinzani PL, 1994; Pettitt AR, 2003).

El clorambucil induce la muerte celular programada en los linfocitos B de LLC-B (Begleiter A, 1994) y su efecto antitumoral se ha atribuido a su capacidad alquilante y formadora de entrecruzamientos en el ADN (Begleiter A, 1991), aunque también puede unirse al ARN y proteínas.

La fludarabina es un análogo de la adenina cuyo principal mecanismo de acción es inhibir la síntesis de ADN actuando sobre un gran número de enzimas (Keating MJ, 1994). Es una prodroga sintética que es rápidamente defosforilada a F-ara-A (9- β -D-arabinofuranosil-2-fluoroadenina) por fosfatasas séricas. F-ara-A es el principal metabolito plasmático de la fludarabina y es capaz de entrar en las células donde se transforma en la forma activa (F-ara-ATP). Esta forma activa parece inhibir la ADN polimerasa α , ribonucleótido reductasa y ADN primasa. La incorporación de F-ara-ATP a las cadenas de ácidos nucleicos elongadas resulta en la finalización de la síntesis de ADN. Además de este efecto, es conocida su gran actividad contra neoplasias de bajo índice mitótico, tal vez en relación a la capacidad que tiene este agente para activar la apoptosis de los linfocitos, tanto en fase de división como de quiescencia (Zinzani PL, 1994; Plosker GL, 2003; Pettitt AR, 2003).

La 2-clorodeoxiadenosina es un análogo de deoxiadenosina que consiste en la sustitución de un átomo de hidrógeno de la posición 2 del anillo de purina por un átomo de cloro y es igualmente activo frente a los linfocitos en división como frente a los que están en reposo. Se considera que permite la acumulación de roturas en las hebras de ADN, que conduce a una activación de la poli (ADP-ribosa) polimerasa que consume el NAD y ATP celular y produce como consecuencia la muerte de la célula (Saven A, 1994). También se ha observado la activación de un programa de muerte celular por apoptosis (Castejón R, 1997), siendo considerado actualmente el principal mecanismo de acción (Pettitt AR, 2003).

La sensibilidad *in vitro* a fármacos quimioterápicos en pacientes con cáncer ha sido investigada durante décadas, más intensamente desde 1978 (Salmon SE, 1978). Aunque los resultados publicados son atractivos, ya que son capaces de identificar la sensibilidad y sobre todo la resistencia a fármacos de un elevado porcentaje de pacientes (Kern DH, 1990; Weisenthal LM, 1985) y consecuentemente podrían ayudar a evitar la

utilización de fármacos ineficaces, la evidencia es que no han conseguido jugar un papel importante en el manejo habitual de los enfermos oncológicos (Bosanquet AG, 1991).

La leucemia linfoide crónica es una de las enfermedades en las que se ha investigado el valor de los ensayos de sensibilidad *in vitro* a fármacos y su posible utilidad clínica. Estas pruebas han sido de dos tipos: estudios de viabilidad celular o de cuantificación de apoptosis.

Los estudios realizados por otros autores (Morabito F, 1996; Bosanquet AG, 1991), en relación a la citotoxicidad inducida por fármacos *in vitro* en la LLC-B, generalmente utilizan análisis de viabilidad celular mediante métodos como el MTT y el DiSC. Bosanquet *et al* determinaron la quimiosensibilidad utilizando un método de exclusión de colorante vital para medir la viabilidad celular (DiSC: differential staining cytotoxicity) y Morabito *et al* un ensayo de viabilidad celular que depende de la reducción enzimática del dimetiltiazol-difeniltetrazolio (MTT) a MTT formazan. Los resultados observados con el ensayo MTT correlacionan bien con los del DiSC (Hanson JA, 1991). Estos métodos valoran en su conjunto el porcentaje de células viables, respecto al de células muertas, sin diferenciar células apoptóticas de necróticas.

La cuantificación de la apoptosis puede ser realizada con diferentes métodos. Los más extendidos son la microscopía óptica o electrónica, los métodos moleculares y los citométricos. La citometría de flujo ofrece diversas posibilidades de determinar el porcentaje de células apoptóticas. Uno de los métodos citométricos más sencillos es la observación de las características de la dispersión de luz de las células apoptóticas, que debido a su disminución en el volumen celular, presentan una menor dispersión de luz hacia delante (FSC o Forward Scatter, equivalente al tamaño celular) y lateral (SSC o Side Scatter, equivalente a la granularidad celular) que las células vivas. Otra forma de determinar la apoptosis es mediante la tinción del ADN con yoduro de propidio (IP). Debido a la condensación de la cromatina y a la fragmentación del núcleo, es lógico que tanto la pérdida de ADN como una disminución en la accesibilidad del IP sean los responsables de la pérdida de la cantidad de fluorescencia que muestran las células apoptóticas. Estas células apoptóticas aparecen como un pico en la zona inmediatamente inferior al pico G₀/G₁ de las células vivas (Nicoletti I, 1991). Sin embargo, estos métodos se han visto superados por la determinación de la apoptosis mediante marcaje con yoduro de propidio y anexina V. Se conoce que uno de los hechos que tienen lugar en la apoptosis temprana es la exposición de la fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática. La anexina V se une preferentemente a los fosfolípidos cargados

como la fosfatidilserina. De este modo, la anexina V conjugada con fluoresceína puede usarse como un marcador para identificar células apoptóticas por citometría de flujo (Castedo M, 1996). Además, gracias al análisis multiparamétrico, se puede cuantificar la apoptosis en poblaciones celulares concretas, utilizando anticuerpos monoclonales frente a células B y T (Bellosillo B, 1999).

Este método de la tinción con anexina V y citometría de flujo ha sido el utilizado en nuestro trabajo, porque permite cuantificar de una forma objetiva, sensible y rápida, el porcentaje de células apoptóticas y además porque los quimioterápicos utilizados (clorambucil, 2-clorodeoxiadenosina, fludarabina) tienen como mecanismo de acción común la inducción de apoptosis. Hemos considerado el porcentaje de células en apoptosis global (precoz y tardía) y se ha relacionado el porcentaje de apoptosis *in vitro* inducido por fármacos, con la apoptosis observada basalmente, sin fármaco. Este cociente nos parece de suma importancia en una entidad como la LLC-B con una predisposición especial a la apoptosis espontánea *in vitro* y porque lleva implícito el aumento de apoptosis atribuible al fármaco en cada paciente.

TRATAMIENTO Y RESPUESTA CLÍNICA DE LOS PACIENTES CON LLC-B

Las características clínicas de la serie de pacientes que presentamos concuerdan con las publicadas en la bibliografía, así como el porcentaje de enfermos tratados, el número de intentos terapéuticos y el tipo de fármacos utilizados, teniendo en cuenta el amplio periodo durante el que fueron seguidos los enfermos. Si se analizan las pautas terapéuticas que se han utilizado en nuestros pacientes a lo largo de los años, corresponden bien con los avances en el tratamiento, que abarca desde agentes alquilantes, análogos de purina, combinación entre ellos, anticuerpos monoclonales y trasplante de progenitores (Rozman C, 1995; Kipps TJ, 2002; Rai KR, 2000). El test de sensibilidad a los fármacos *in vitro* en nuestros pacientes se realizó entre 1996 y el año 2002. No fue un estudio prospectivo y por tanto el médico encargado del manejo clínico de los pacientes eligió el momento y pauta terapéutica más adecuada, que no fue siempre clorambucil o fludarabina aislados. El seguimiento se extendió durante varios años, ya que se intentó incluir un número más elevado de pacientes tratados y algunos no recibieron quimioterapia hasta varios años después del estudio de apoptosis *in vitro*

en nuestro laboratorio. Las respuestas a agentes alquilantes solos vs agentes alquilantes asociados a prednisona o de fludarabina como fármaco aislado vs fludarabina asociada a otros fármacos, se consideraron juntas. Aunque el porcentaje de respuestas de nuestros pacientes parece favorecer el tratamiento combinado, nuestro estudio es retrospectivo y no es posible comparar las respuestas terapéuticas de los pacientes al no ser grupos homogéneos. Además, los datos de la literatura médica no están claros a este respecto (Han T, 1973; Jaksic B, 1988; Rai KR, 2000; O'Brien S, 2001a), si bien la utilización de algunas combinaciones farmacológicas parece conseguir un número mayor de respuestas clínicas (Bosch F, 2002).

APOPTOSIS ESPONTÁNEA E INDUCIDA POR FÁRMACOS (CLORAMBUCIL, FLUDARABINA Y 2-CLORODEOXIADENOSINA) EN LINFOCITOS B DE SANGRE PERIFÉRICA DE LOS PACIENTES CON LLC-B

A diferencia de lo que ocurre *in vivo*, cuando se incuban las células de la LLC-B se produce, ya en las primeras 24 horas, muerte celular espontánea por apoptosis a pesar de la presencia de suero bovino fetal en el medio de cultivo (Collins RJ, 1989). Este hecho sugiere que la prolongada supervivencia *in vivo* de los linfocitos de LLC-B puede atribuirse a factores humorales o celulares capaces de proteger a estas células de la muerte por apoptosis (Castejón R, 1999; Gallego A, 2003). Los pacientes que estaban recibiendo tratamiento en el momento del estudio no presentaron un aumento en el porcentaje de células apoptóticas, lo que no permite aclarar si las células que se incubaban estaban sensibilizadas o resistentes al fármaco.

Se investigó la inducción de apoptosis *in vitro* por los agentes quimioterápicos de los dos grupos terapéuticos básicos, clorambucil, fludarabina y 2-CdA, utilizando dosis equivalentes a las farmacológicas, observándose que existía con los tres fármacos un aumento significativo de la apoptosis, en relación con la espontánea en los mismos periodos de incubación (Tabla 9). Cuando se comparó con cada fármaco individual los resultados a 24 y 48 horas, sólo se observaron diferencias significativas en el grupo de los análogos de purina. Aunque no existe una explicación plausible, parece que la duración de la eficacia *in vitro* de los análogos de purina es mayor que la de los agentes alquilantes. Consecuentemente, cuando se investigaron los índices de apoptosis para

cada fármaco en ambos periodos de tiempo, se volvió a encontrar diferencias en las muestras incubadas con fludarabina y con 2-CdA.

La comparación de los índices de apoptosis con los tres fármacos no mostró diferencias significativas en ninguno de los periodos de tiempo (Tabla 10). Morabito *et al* concluyen, utilizando un ensayo que mide viabilidad celular, que por unidad de concentración la mayor potencia para inducir apoptosis *in vitro* corresponde a la 2-CdA seguida de fludarabina y clorambucil, pero cuando se consideran los resultados obtenidos, comparando las concentraciones equivalentes a los niveles que los fármacos alcanzan en plasma, la droga más eficaz es la fludarabina seguida de 2-CdA y de clorambucil (Morabito F, 1996). Estas diferencias pueden explicarse por las distintas técnicas utilizadas, los variados tiempos de incubación o por una mayor concentración de clorambucil en nuestro estudio. Por otra parte, no está claro el grado de concordancia de la calidad de la respuesta *in vitro* con ambas familias terapéuticas (Silber R, 1994; Bosanquet AG, 1991; Bosanquet AG, 1999a); en nuestra serie 8 pacientes que tuvieron índices de apoptosis por clorambucil iguales o menores a 1,3 presentaban índices de apoptosis por fludarabina iguales o mayores a 1,7 y en otros 8 pacientes ocurrió lo contrario (Tabla 10).

De forma esperada, se observó un elevado coeficiente de correlación entre los dos análogos de purina (Tabla 10), ya que son fármacos con el mismo mecanismo de acción y respuestas clínicas semejantes. Esta concordancia apoya la fiabilidad de los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro*. Aunque en general existe concordancia entre ambos análogos de purina, y la mayoría de las muestras que son sensibles a fludarabina lo son también a 2-CdA, en la bibliografía aparece un grado variable de discordancia que oscila entre el 10 y el 30% utilizando técnicas de DiSC y MTT (Bosanquet AG, 1999b; Morabito F, 1996; Begleiter A, 1995). Del mismo modo, también existe controversia sobre la utilización de 2-CdA en pacientes con resistencia clínica a fludarabina (Juliussen G, 1992; O'Brien S, 1994).

Con respecto a la influencia del tratamiento previo, se tuvieron en cuenta los pacientes que habían recibido tratamiento previo al estudio *in vitro* y los que estaban siendo tratados en dicho momento; el análisis de estos subgrupos permite afirmar que los pacientes que han recibido tratamiento previo con agentes alquilantes muestran un menor índice de apoptosis inducida por fludarabina, lo que sugiere una posible resistencia cruzada entre ambos fármacos. En la práctica clínica, los pacientes tratados previamente con agentes alquilantes responden peor a fludarabina que los que no han

recibido tratamiento previo (Sorensen JM, 1997). Utilizando el método MTT, Silber *et al* demuestran que la concentración de clorambucil requerida para obtener el mismo efecto de apoptosis *in vitro* es mayor en los pacientes tratados previamente (sobre todo con clorambucil) que en los no tratados (Silber R, 1994) y por otra parte, que esta concentración aumenta rápidamente en el plazo de pocas semanas cuando se comienza tratamiento con dicho fármaco. Con la misma técnica, otros autores no encuentran valores diferentes para clorambucil y si una mayor tendencia de resistencia *in vitro* a fludarabina (Morabito F, 1996). Más recientemente, Bosanquet *et al* describen un mayor porcentaje de pacientes con resistencias *in vitro* a fludarabina en el grupo que ha recibido tratamiento previo (31%), sobre todo si el fármaco administrado es fludarabina (53%), cuando se compara con el grupo de pacientes que no ha sido tratado previamente (12%) (Bosanquet AG, 1999a). Estos mismos autores, en una publicación previa, utilizando el método DiSC para cuantificar la muerte celular, investigan el desarrollo de resistencias pleiotrópicas (resistencias a diversas drogas con mecanismos distintos) inducidas por tratamientos previos con varios tipos de fármacos. En su trabajo concluyen que el clorambucil y la fludarabina inducen pocas resistencias pleiotrópicas y por el contrario, la ciclofosfamida y antraciclinas las inducen con frecuencia; curiosamente, el tratamiento previo con clorambucil determina un aumento de la sensibilidad *in vitro* a esteroides (Bosanquet AG, 1996).

Por último, aunque en nuestro trabajo no se ensayó la combinación de fármacos *in vitro*, varios grupos han explorado el comportamiento de drogas asociadas, demostrando el efecto sinérgico o aditivo de algunas de ellas. Se han ensayado en diferentes combinaciones, entre otras, clorambucil, ciclofosfamida, metilprednisolona, fludarabina, 2-CdA, pentostatina, mitoxantrona, doxorubicina, etopósido y citarabina (Morabito F, 1997a; Callea I, 1998; Bosanquet AG, 1995; Bellosillo B, 1998; Bellosillo B, 1999; Kano Y, 2000).

CORRELACIÓN ENTRE LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y LA APOPTOSIS IN VITRO INDUCIDA POR FÁRMACOS EN LOS PACIENTES CON LLC-B

La historia natural de la LLC-B es extremadamente variable, mientras algunos pacientes tienen un curso evolutivo rápido otros evolucionan más lentamente y alcanzan

supervivencias similares a las de la población general (Kipps TJ, 2002; Rai KR, 2000). Este comportamiento heterogéneo y las elevadas expectativas terapéuticas actuales, aumentan la importancia de mejorar nuestra habilidad para identificar pacientes de mal pronóstico (Shanafelt TD, 2004). Los tratamientos recientes con anticuerpos monoclonales en combinación con quimioterapia han conseguido respuestas extraordinarias (Schutz H, 2002; Byrd JC, 2003) y existen progresos en el campo del trasplante de progenitores hematopoyéticos en pacientes jóvenes con enfermedad refractaria o agresiva (Ritgen M, 2003). No obstante, todavía no hay seguimientos suficientemente largos para comprobar una mejoría de la supervivencia.

A lo largo de los años se ha investigado el significado pronóstico de determinadas características en los pacientes con LLC-B. Aunque todavía no existe un modelo estadístico en la práctica clínica, en base a los resultados descritos en la bibliografía, se recomienda atender especialmente (Shanafelt TD, 2004) al estadio clínico de Rai o de Binet (Rai KR, 1975; Binet JL, 1981), al tiempo de duplicación linfocitaria (Montserrat E, 1986), a la $\beta 2$ microglobulina (Keating MJ, 1995; Molica S, 1999), a los hallazgos citogenéticos por FISH (Dohner H, 2000), al porcentaje de expresión de CD38 (Damle RN 1999; Hambling TJ, 2002) y si es posible al estado mutacional de la región variable de la cadena pesada de las inmunoglobulinas IgVh (Damle RN, 1999; Hambling TJ, 1999; Krober A, 2002) y a la cuantificación de la proteína ZAP-70 (Wiestener A, 2003; Crespo M, 2003).

En el trabajo actual se realizó un estudio de correlación de diferentes variables clínicas con los índices de apoptosis *in vitro* a clorambucil y a fludarabina a las 24 y a las 48 horas de incubación. Se analizó la edad y sexo, el estadio de Rai y de Binet, la cifra y morfología de linfocitos en sangre periférica, el tiempo de duplicación linfocitaria (TDL), el patrón de afectación de la médula ósea, la tasa sérica de $\beta 2$ microglobulina, la cuantificación de inmunoglobulinas y las anomalías cromosómicas. Recientemente, en tres casos de la serie se determinó la proteína ZAP-70. Cabe destacar que se analizaron las características clínicas que los pacientes presentaban en la fecha de realización del ensayo en el laboratorio, excepto la biopsia de médula ósea, el estudio genético y el tiempo de duplicación linfocitaria que fueron realizados en otros momentos. Esto es importante, ya que los factores pronósticos pueden cambiar con la evolución de la enfermedad, incluso las anomalías cromosómicas (Fegan C, 1995) y la expresión de CD38 (Hambling TJ, 2002).

Nuestros resultados sugieren que la apoptosis inducida por clorambucil y fludarabina guarda relación con los estadios de Rai y de Binet: con clorambucil los pacientes con estadios intermedios (Rai I-II y Binet B) tuvieron índices menores que los de estadios precoces (Rai 0 y Binet A), sobre todo a 24 horas y con fludarabina y 2-CdA los pacientes con estadios más avanzados (Rai III-IV y Binet C) tuvieron un menor índice que los de estadios más precoces (Rai 0 y Binet A), sobre todo a 48 horas. Este diferente comportamiento temporal quizá guarde relación con la eficacia de ambas drogas en los dos tiempos de incubación. El nivel sérico de $\beta 2$ microglobulina también marcó diferencias significativas en el porcentaje de muerte celular inducida por ambas drogas, concordante probablemente con la relación que existe entre el estadio clínico y los niveles de $\beta 2$ microglobulina (Spati B, 1980; Simonsson B, 1980). Del resto de los parámetros estudiados, sólo se encontró correlación de la apoptosis inducida por fludarabina a las 24 horas con el tiempo de duplicación linfocitaria, la expresión de CD38 y la delección p53 (cuando se encontraba combinada con otras anomalías genéticas). Más consistentes fueron las alteraciones del cariotipo, ya que se observó que el índice de apoptosis con fludarabina en los dos periodos de tiempo fue significativamente inferior en pacientes con cariotipo complejo (igual o más de tres anomalías cromosómicas) que en aquellos con cariotipo normal y se acercó al significado estadístico si se comparaba con los de cariotipo anormal (una o dos alteraciones cromosómicas). En los tres pacientes en los que se determinó la proteína ZAP-70, dos con expresión celular de la proteína superior al 20% y uno con expresión del 2%, no se encontró paralelismo con los índices de apoptosis inducida por fármacos. También es destacable la correlación inversa cuando se tuvo en cuenta el patrón de médula ósea, de tal manera que los pacientes con afectación difusa tuvieron índices de apoptosis inducida por fármacos más elevados que los que tenían afectación nodular, intersticial o mixta.

En los trabajos publicados, se ha insistido poco en la correlación de factores pronósticos y muerte celular *in vitro* inducida por fármacos. El grupo de Morabito no encuentra correlación entre la viabilidad celular en presencia de clorambucil y fludarabina *in vitro*, con los estadios de Rai y Binet ni con el tiempo de duplicación linfocitaria, pero si con los niveles de LDH y el patrón de afectación medular (Morabito F, 1996). Tampoco Silber *et al* encuentran relación entre el estadio clínico y la respuesta a clorambucil *in vitro* (Silber R, 1994), ni Bosanquet *et al* entre la edad y la muerte celular con diferentes familias de fármacos (Bosanquet AG, 2000). El grupo de

Montserrat, igualmente no observa correlación entre el estadio clínico, la $\beta 2$ microglobulina, la trisomía del cromosoma 12 y el inmunofenotipo con la muerte celular inducida por fármacos *in vitro* (Bellosillo B, 1999).

Posiblemente los diferentes tipos de técnicas utilizadas para cuantificar la muerte celular *in vitro*, los variables periodos de incubación de los fármacos y los distintos momentos de recogida de los factores pronósticos con respecto a la fecha del ensayo en el laboratorio, puedan explicar la discordancia con nuestros resultados. Es planteable no obstante, que la extensión de la enfermedad y la masa tumoral implícitas en algunos de los factores pronósticos clásicos, determinen una supervivencia diferente, pero no necesariamente una distinta sensibilidad a los fármacos.

El gen p53 es un regulador fundamental de la muerte celular a través del daño en el ADN, cuya inactivación por mutación o delección alélica se encuentra en el 10-15% de los pacientes (El Rouby S, 1993; Silber R, 1994; Dohner H, 1995), sobre todo si han sido tratados previamente (Sturm I, 2003). Existe una correlación positiva entre la inactivación del gen p53 y la resistencia clínica al clorambucil (El Rouby S, 1993; Silber R, 1994) y a los análogos de purina (Dohner H, 1995), así como con la mortalidad (Sturm I, 2003). No obstante, existen pacientes con el gen p53 mutado que pueden responder a clorambucil o fludarabina y enfermos con p53 no mutado resistentes a los mismos fármacos, por lo que no parece un factor definitivo en la resistencia a drogas en la leucemia linfocítica crónica (Morabito F, 1997b; El Rouby S, 1993). Cuando se ha investigado la capacidad *in vitro* de inducción de muerte celular por clorambucil o fludarabina, las concentraciones de fármaco necesarias para un mismo efecto en la apoptosis, fueron más altas en el subgrupo de pacientes con p53 mutado que en el que tenía p53 tipo salvaje (Sturm I, 2003).

El estudio de la expresión de otras proteínas implicadas en los mecanismos de apoptosis, como por ejemplo la familia de bcl-2, demuestra que no existe correlación entre los niveles de estas y la inducción farmacológica de apoptosis *in vitro* (Morabito F, 1997b; Bosanquet AG, 2002).

CORRELACIÓN ENTRE LA RESPUESTA CLÍNICA AL TRATAMIENTO Y LA APOPTOSIS *IN VITRO* INDUCIDA POR FÁRMACOS EN LOS PACIENTES CON LLC-B

Los modernos avances terapéuticos en la leucemia linfoide crónica son prometedores y es posible que mejoren la supervivencia de los pacientes, pero en la actualidad la falta de un tratamiento curativo junto con el curso heterogéneo de la enfermedad y la diversidad de tratamientos hacen necesario el desarrollo de pautas adaptadas a factores de riesgo. Entre estos se encuentran los relacionados con el propio tratamiento, como la sensibilidad de la enfermedad al tratamiento, las terapias previas, el número de intentos terapéuticos, el grado y la calidad de las respuestas y el estado de la enfermedad residual mínima (Montserrat E, 2001). La relevancia de lo dicho estriba en que la respuesta al tratamiento es un factor pronóstico en sí mismo (Catovsky D, 1989). El impacto de la respuesta inicial en los intentos terapéuticos posteriores debe ser considerado ya que pacientes refractarios o que recaen a los agentes alquilantes, responden peor a los análogos de purina y la falta de respuesta a estos hace difícil el rescate con otros procedimientos terapéuticos (Montserrat E, 2001).

Por razones obvias, la posibilidad de predecir la respuesta a diferentes modalidades terapéuticas basándonos en modelos *in vitro* es atractiva. Entre los ensayos de citotoxicidad utilizados destaca el MTT y el DiSC, ya comentados (Bosanquet AG, 1991; Morabito F, 1996; Bellosillo B, 1999). Estas técnicas no han sido utilizadas de manera rutinaria, pero varios estudios han analizado la correlación entre los resultados *in vitro* y la respuesta terapéutica *in vivo*. Si este procedimiento de laboratorio identificara adecuadamente a los pacientes, consiguiendo prever la respuesta a un determinado fármaco, se podría evitar la exposición innecesaria a determinados medicamentos no efectivos, sus efectos tóxicos, el gasto económico adicional y la aparición de resistencias (Montserrat E, 2001).

Con la técnica que hemos utilizado en el trabajo actual para cuantificar la apoptosis espontánea e inducida por fármacos (anexina V/ioduro de propido), no se encontró correlación positiva entre las respuestas clínicas al tratamiento con agentes del grupo alquilante (GA), fundamentalmente clorambucil y los índices de la apoptosis *in vitro* inducida por clorambucil a las 24 ni a las 48 horas de incubación. Esta falta de correlación se mantuvo cuando se excluyeron los pacientes que habían recibido tratamiento previo con fármacos del GA.

Cuando se intentó buscar la correlación en el grupo que recibió análogos de purina, se observó que a las 48 horas de incubación los pacientes que respondían clínicamente a fármacos de este grupo tuvieron índices significativamente más elevados que los que no presentaron respuesta clínica. En los casos que pudieron ser evaluados, ya que no todos tenían la determinación *in vitro* realizada a las 48 horas, se constató que de los 9 que respondieron clínicamente, 7 presentaban índices por encima de 1,7 y dos, índices de 1,2 y 1,0. El paciente que tuvo un índice de apoptosis de 1,0 lo presentó para todos los fármacos y en todos los periodos de tiempo, lo que nos indujo a comprobar sus valores de apoptosis espontánea, observando que era inusualmente elevada, la mayor de los 50 pacientes (85 y 87% en los dos periodos de incubación), por lo que consideramos que su inclusión en la valoración de la respuesta de muerte celular inducida por fármacos era muy cuestionable ya que casi todas las células se morían espontáneamente. Los dos pacientes que no presentaron respuesta clínica tuvieron índices de 1,0 y 1,1. Por tanto, podemos inferir que en nuestro estudio el valor predictivo positivo (pacientes con índices elevados de apoptosis que presentaron respuesta clínica) fue de 1 y el valor predictivo negativo (pacientes con índices bajos de apoptosis que no respondieron clínicamente) de 0,66. Estos datos no se modificaron cuando se excluyeron los pacientes que habían recibido tratamiento previo con fármacos del GA.

Uno de los inconvenientes de nuestro estudio es que el tiempo transcurrido entre el ensayo en el laboratorio y el tratamiento, fue variable y con frecuencia prolongado y se ha descrito que la sensibilidad *in vitro* a los fármacos puede variar con el tiempo (Silber R, 1994; Morabito, 1996), lo que hace sugerir a algunos autores que dicho periodo no sea superior a un año (Bosanquet AG, 1999a). Por otra parte, algunos de nuestros enfermos tratados con clorambucil, lo fueron únicamente con anterioridad al ensayo *in vitro*.

Las publicaciones que analizan el valor predictivo de la muerte celular *in vitro* inducida por fármacos y la respuesta clínica a estos mismos fármacos en la LLC-B, son escasas y no siempre fáciles de interpretar ya que utilizan métodos y periodos de incubación *in vitro* diferentes, distintas concentraciones de fármacos, porcentajes variables de enfermos con tratamiento previo e incluso métodos diferentes de evaluación de la respuesta clínica. Estos trabajos, aunque no siempre concordantes, en general apoyan el valor predictivo de la muerte celular *in vitro* inducida por análogos de purina en la respuesta clínica.

Existen pocos estudios de correlación *in vitro/in vivo* con clorambucil y por tanto, las conclusiones no son definitivas. Silber *et al* en una muestra de 15 pacientes, encuentran una correlación positiva entre la concentración de clorambucil requerida para inhibir viabilidad celular y la respuesta clínica a dicho fármaco (Silber R, 1994). Callea *et al* en un estudio de 29 pacientes tratados con dosis altas de clorambucil, encuentran que los niveles de apoptosis *in vitro* pueden predecir la respuesta clínica pero, sugieren que deben ser explorados otros marcadores biológicos (Callea V, 1999). Las altas dosis de clorambucil utilizadas clínicamente en su estudio hace difícil sacar conclusiones definitivas.

Los estudios con análogos de purina son más contundentes, aunque los resultados no son uniformes. Higenfeld *et al* fracasan en el intento de encontrar algún tipo de correlación entre la citotoxicidad *in vitro* y la respuesta clínica en 9 pacientes (Higenfeld E, 1995). Gottardi *et al*, utilizando yoduro de propidio, en una serie de 10 pacientes, encuentran que 5 con apoptosis prominente respondían al tratamiento con fludarabina, pero sólo 3 de los 5 con un porcentaje bajo de apoptosis no tuvieron respuesta clínica (Gottardi D, 1997). Bromidge *et al* trataron 12 pacientes con análogos de purina y utilizando la técnica de TdT (terminal deoxynucleotidyl transferase) para cuantificar apoptosis, fueron capaces de predecir la respuesta clínica en 10 de 12 pacientes (Bromidge TJ, 1998). Más consistentes son los trabajos del grupo italiano y británico (Morabito F, 1998; Bosanquet AG, 1999a). Los investigadores italianos, en una serie de 31 pacientes observan una estrecha correlación entre los diferentes tipos de respuesta clínica y las concentraciones de droga *in vitro* necesarias para conseguir el mismo efecto apoptótico. Los pacientes sensibles *in vitro* respondieron clínicamente, pero el 50% de los pacientes que no respondieron *in vitro* lo hicieron clínicamente. El grupo inglés, en una serie de 66 pacientes, comunicó que los enfermos cuyas muestras eran sensibles *in vitro* a fludarabina respondieron clínicamente en el 69%, pero en los que eran resistentes *in vitro*, sólo se documentó respuesta clínica en el 7%. Además, los pacientes que presentaban sensibilidad *in vitro* a la fludarabina tenían una mediana de supervivencia mayor que los que presentaban resistencia y en este último grupo, los pacientes tratados con fludarabina sobrevivían menos que los tratados con otros fármacos. Un estudio de los mismo autores sobre las ventajas económicas de utilizar el ensayo de DiSC en el manejo de los pacientes con LLC-B, sugiere que el método es coste-efectivo (Mason JM, 1999).

Con 2-CdA los resultados son semejantes a los publicados con fludarabina y así, en un estudio de 34 pacientes la respuesta *in vitro* fue predictora de la respuesta clínica en 32, ya que sólo 2 pacientes sensibles al fármaco *in vitro* no respondieron clínicamente (Bosanquet AG, 1999b).

Se han realizado estudios de correlación de apoptosis *in vitro* y respuesta clínica con otros fármacos como la metilprednisolona con escaso número de pacientes, pero resultados alentadores (Bosanquet AG, 1995) y de forma más consistente el grupo de Barcelona demuestra en 20 pacientes una correlación positiva entre viabilidad celular *in vitro* de muestras incubadas con fludarabina, ciclofosfamida y mitoxantrona y la respuesta clínica con dicha combinación (Bosch F, 2002).

Dado el escaso número de pacientes de nuestro estudio, no es posible extraer conclusiones definitivas, pero podría conjeturarse que los pacientes que presentan un índice de apoptosis a las 48 horas de incubación con fludarabina por encima de 1,5 tendrían altas expectativas de respuesta clínica, mientras que por debajo de 1,5 la predicción de falta de respuesta sería algo menor (Castejón R, 1997; Morabito F, 1998).

A la vista de nuestros resultados, el estudio de la apoptosis *in vitro* inducida por fármacos puede predecir la respuesta terapéutica en pacientes con LLC-B tratados con análogos de purina. Es necesario en un futuro, realizar un estudio prospectivo que defina con claridad el papel de la apoptosis *in vitro* como ensayo predictivo de respuesta terapéutica.

CONCLUSIONES

1. El clorambucil y los análogos de purina, fludarabina y 2-clorodeoxiadenosina, inducen apoptosis *in vitro* en los linfocitos B de pacientes con LLC-B a concentraciones equivalentes a las alcanzadas con su uso farmacológico.
2. El valor de la media de los índices de apoptosis inducida por clorambucil no mostró diferencias significativas con respecto al observado con análogos de purina.
3. Los índices de apoptosis *in vitro* observados con fludarabina y 2-clorodeoxiadenosina son similares, mostrando un elevado coeficiente de correlación.
4. Los pacientes con LLC-B que han recibido tratamiento previo con agentes alquilantes muestran un menor índice de apoptosis *in vitro* inducido por fludarabina.
5. Los índices más bajos de apoptosis *in vitro* inducida por clorambucil en pacientes con LLC-B se relacionan con el estadio clínico avanzado y los niveles altos de $\beta 2$ microglobulina. Los índices más bajos de apoptosis *in vitro* inducida por fludarabina se relacionaron igualmente con el estadio clínico avanzado y los niveles de $\beta 2$ microglobulina y además con un tiempo de duplicación linfocitaria <12 meses, $CD38 >30\%$, disfunción p53 y cariotipo complejo.
6. Es posible establecer una correlación entre las respuesta *in vitro* y la respuesta clínica al tratamiento con fludarabina en pacientes con LLC-B, no así en el caso de clorambucil. En nuestra serie aquellos pacientes que presentaron un índice de apoptosis inducida por fludarabina $>1,7$ respondieron clínicamente al tratamiento con fludarabina.
7. El estudio de la apoptosis *in vitro* inducida por fármacos puede predecir la respuesta terapéutica *in vivo* en pacientes con LLC-B tratados con análogos de purina. Es necesario realizar un estudio prospectivo que defina claramente el papel de la apoptosis *in vitro* como ensayo predictivo de respuesta terapéutica.

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

Albers, H. J. (1944) *...*

BIBLIOGRAFÍA

Anaissie EJ, Kontoyiannis DP, O'Brien S, Kantarjian H, Robertson L, Lerner S, Keating MJ. Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine. *Ann Intern Med*, 1998; 129: 559-66.

Arends MJ, Morris RG, Wyllie AH. Apoptosis: the role of endonuclease. *Am J Pathol* 1990; 136: 593-608.

Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998; 281: 1305-08.

Barragán M, Campás C, Bellosillo B, Gil J. Protein kinases in the regulation of apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia Lymphoma* 2003; 44: 1865-70.

Begleiter A, Goldenberg GJ, Anhalt CD, Lee K, Mowat MRA, Israels LG, Johnston JB. Mechanisms of resistance to chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 1991; 15: 1019-27.

Begleiter A, Lee K, Israels LG, Mowat MRA, Johnston JB. Chlorambucil induced apoptosis in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and its relationship to clinical efficacy. *Leukemia* 1994; 8: 103-06.

Begleiter A, Verburg L, Ashique A, Lee K, Israels LG, Mowat MRA, Johnston JB. Comparison of antitumor activities of 2-chlorodeoxyadenosine and 9- β -arabinosyl-2-fluoroadenine in chronic lymphocytic leukemia and marrow cells *in vitro*. *Leukemia* 1995; 9: 1875-81.

Begleiter A, Wang H, Verburg L, Lee K, Israels LG, Mowat MRA, Johnston JB. *In vitro* cytotoxicity of 2-chlorodeoxyadenosine and chlorambucil in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1959-65.

Bellosillo B, Colomer D, Pons G, Gil J. Mitoxantrone, a topoisomerase II inhibitor, induces apoptosis of B-chronic lymphocytic leukaemia cells. *Br J Haematol* 1998; 100: 142-6.

Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, Pons G, Montserrat E, Gil J. *In vitro* evaluation of fludarabine in combination with cyclophosphamide and/or mitoxantrone in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 2836-43.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, Sultan C. Proposals for the classification of chronic (mature) B and T lymphoid leukaemias. French-American-British (FAB) Cooperative Group. *J Clin Pathol* 1989; 42: 567-84.

Berrocal E, Llamas P, Vargas JA, Durantez A. Citocinas y leucemia linfática crónica B. *Sangre (Barc)* 1997; 42: 39-46.

Binet JL, Auquier A, Dighiero G, Chastang C, Piguët H, Goasguen J, Vaugier G, Potron G, Colona P, Oberling F, Thomas M, Tchernia G, Jacquillat C, Boivin P, Lesty C, Duault MT, Monconduit M, Belabbès S, Gremy F. A new prognostic classification of

chronic lymphocytic leukemia derived from a multivariate survival analysis. *Cancer* 1981; 48: 198-206.

Bosanquet AG, Bell PB. Novel ex vivo analysis of nonclassical, pleiotropic drug resistance and collateral sensitivity induced by therapy provides a rationale for treatment strategies in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1996; 87: 1962-71.

Bosanquet AG, Bosanquet MI. Ex vivo assessment of drug response by differential staining cytotoxicity (DiSC) assay suggest a biological basis for equality of chemotherapy irrespective of age for patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia* 2000; 14: 712-15.

Bosanquet AG, Copplestone JA, Johnson SAN, Smith AG, Povey SJ, Orchard JA, Oscier DG. Response to cladribine in previously treated patients with chronic lymphocytic leukaemia identified by ex vivo assessment of drug sensitivity by DiSC assay. *Br J Haematol* 1999b; 106: 474-76.

Bosanquet AG, Johnson SAN, Richards SM. Prognosis for fludarabine therapy of chronic lymphocytic leukaemia based on ex vivo drug response by DiSC assay. *Br J Haematol* 1999a; 106: 71-77.

Bosanquet AG, McCann SR, Crotty GM, Mills MJ, Catovsky D. Methylprednisolone in advanced chronic lymphocytic leukaemia: rationale for, and effectiveness of treatment suggested by DiSC assay. *Acta Haematol* 1995; 93: 73-79.

Bosanquet AG, Sturm I, Wieder T, Essmann F, Bosanquet MI, Head DI, Dörken B, Daniel PT. Bax expression correlates with cellular drug sensitivity to doxorubicin, cyclophosphamide and chlorambucil but not fludarabine, cladribine or corticosteroids in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2002; 16: 1035-44.

Bosanquet AG. Correlations between therapeutic response of leukaemias and in-vitro drug-sensitivity assay. *Lancet* 1991; 337: 711-14.

Bosch F, Ferrer A, López-Guillermo A, Giné E, Bellosillo B, Villamor N, Colomer D, Cobo F, Perales M, Esteve J, Altés A, Besalduch J, Ribera JP, Montserrat A for the GELCAB (Grup per l'estudi dels limfomes a Catalunya i Balears). Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 2002; 119: 976-84.

Böyum AJ. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand J Clin Lab Invest* 1968; 21: 77-89.

Briz M, Cabrera R, Sanjuan I, Fores R, Diez JL, Herrero M, Regidor C, Algora M, Fernandez MN. Diagnosis of transfusion-associated graft-versus-host disease by polymerase chain reaction in fludarabine-treated B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1995; 91: 409-11.

Bromidge TJ, Turner DL, Howe DJ, Johnson SA, Rule SAJ. In vitro chemosensitivity of chronic lymphocytic leukemia to purine analogues-correlation with clinical course. *Leukemia* 1998; 12:1230-35.

Byrd JC, Peterson BL, Morrison VA, Park K, Jacobson R, Hoke E, Vardiman JW, Rai K, Schiffer CA, Larson RA. Randomized phase 2 study of fludarabine with concurrent versus sequential treatment with rituximab in symptomatic, untreated patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B 9712 (CALGB 9712). *Blood* 2003; 101: 6-14.

Callea I, Console G, Sculli G, Filangri M, Messina G, Morabito F. Chlorambucil synergizes with purine analogs in inducing in vitro cytotoxicity in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 1998; 83: 756-57.

Callea V, Stelitano C, Callea I, Console G, Brugiattelli M, Morabito F. In vitro drug-induced cytotoxicity predicts clinical response to high-dose chlorambucil in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 1999; 84: 863-64.

Carbonari M, Cibati M, Fiorilli M. Measurement of apoptotic cells in peripheral blood. *Cytometry* 1995; 22: 161-67.

Castedo M, Hirsch T, Susin SA, Zamzani N, Marchetti P, Macho A, Kroemer G. Sequential acquisition of mitochondrial and plasma membrane alterations during early lymphocyte apoptosis. *J Immunol* 1996; 157: 512-21.

Castejón R, Vargas JA, Briz M, Berrocal E, Romero Y, Gea-Banacloche JC, Fernández MN, Durántez A. Induction of apoptosis by 2-chlorodeoxyadenosine in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1997; 11: 1253-57.

Castejón R, Vargas JA, Romero Y, Briz M, Muñoz RM, Durántez A. Modulation of apoptosis by cytokines in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 1999; 38: 224-30.

Catovsky D, Fooks J, Richards S. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia: the importance of age, sex and response to treatment in survival. *Br J Haematol* 1989; 72: 141-49.

Chen L, Widhopf G, Huynh L, Rassenti L, Rai KR, Weiss A, Kipps TJ. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 4609-14.

Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, O'Brien S, Rai KR. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 1996; 87: 4990-97.

Cheson BD, Bennett JM, Rai KR, Grever MR, Kay NE, Schiffer CA, Oken MM, Keating MJ, Boldt DH, Kempin SJ. Guidelines for clinical protocols for chronic lymphocytic leukemia: recommendations of the National Cancer Institute-sponsored working group. *Am J Hematol* 1988; 29: 152-63.

Cheson BD, Frame JN, Vena D, Quashu N, Sorensen JM. Tumor lysis syndrome: an uncommon complication of fludarabine therapy of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2313-20.

Cheson BD, Vena DA, Barrett J, Freidlin B. Second malignancies as a consequence of nucleoside analog therapy for chronic lymphoid leukemias. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2454-60.

Chikkappa G, Pasquale D, Phillips PG, Mangan KF, Tsan MF. Cyclosporin-A for the treatment of pure red cell aplasia in a patient with chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 1987; 26: 179-89.

Chisesi T, Capnist G, Dal Fior S. Splenic irradiation in chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1991; 46: 202-04.

Chun HG, Leyland-Jones B, Cheson BD. Fludarabine phosphate: a synthetic purine antimetabolite with significant activity against lymphoid malignancies. *J Clin Oncol* 1991; 9: 175-88.

Clavic M, Miglino M, Spriano M, Pietrasanta D, Vallebella E, Celesti L, Canepa L, Pierri I, Cavaliere M, Ballerini F, Beltrami G, Rossi E, Vimercati R, Bruni R, Congiu M, Nati S, Damasio E, Santini G, Gobbi M. First line fludarabine treatment of symptomatic chronic lymphoproliferative diseases: clinical results and molecular analysis of minimal residual disease. *Eur J Haematol* 1998; 61:197-203.

Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, Prentice RL, Pope JH, Kerr JF. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol* 1989; 71: 343-50.

Cooper IA, Ding JC, Adams PB, Quinn MA, Brettell M. Intensive leukapheresis in the management of cytopenias in patients with chronic lymphocytic leukaemia (CLL) and lymphocytic lymphoma. *Am J Hematol* 1979; 6: 387-98.

Cooperative Group for the Study of Immunoglobulin in Chronic Lymphocytic Leukemia. Intravenous immunoglobulin for the prevention of infection in chronic lymphocytic leukemia. A randomized, controlled clinical trial. *N Engl J Med* 1986; 319: 902-7.

Crespo M, Bosch F, Villamor N, Bellosillo B, Colomer D, Rozman M, Marce S, Lopez-Guillermo A, Campo E, Montserrat E. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003; 348: 1764-75.

Crossen PE. Genes and chromosomes in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 94: 51

Damle RN, Ghiotto F, Valetto A, Albesiano E, Fais F, Yan XJ, Sison CP, Allen SL, Kolitz J, Schulman P, Vinciguerra VP, Budde P, Frey J, Rai KR, Ferrarini M, Chiorazzi N. B cell chronic lymphocytic leukemia cells express a surface membrane phenotype of activated antigen-experienced B lymphocytes. *Blood* 2002; 99:4087-93.

Damle RN, Wasil T, Fais F, Ghiotto F, Valetto A, Allen SL, Buchbinder A, Budman D, Dittmar K, Kolitz J, Lichtman SM, Schulman P, Vinciguerra VP, Rai KR, Ferrarini M,

Chiorazzi N. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1840-47.

De Rossi G, Zarcone D, Mauro F, Cerruti G, Tenca C, Puccetti A, Mandelli F, Grossi CE. Adhesion molecule expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: malignant cell phenotypes define distinct disease subsets. *Blood* 1993; 81: 2679-87.

Del Poeta G, Maurillo L, Venditti A, Buccisano F, Epiceno AM, Capelli G, Tamburini A, Suppo G, Battaglia A, Del Principe MI, Del Moro B, Masi M, Amadori S. Clinical significance of CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98: 2633-39.

Diehl LF, Karnell LH, Menck HR. The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. The National Cancer Data Base report on age, gender, treatment, and outcomes of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1999; 86: 2684-92.

Diehl LF, Ketchum LH. Autoimmune disease and chronic lymphocytic leukemia: autoimmune hemolytic anemia, pure red cell aplasia, and autoimmune thrombocytopenia. *Semin Oncol* 1998; 25: 80-97.

Dighiero G, Maloum K, Desablens B, Cazin B, Navarro M, Leblay R, Leporrier M, Jaubert J, Lepeu G, Dreyfus B, Binet JL, Travade P. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 1998; 338: 1506-14.

Dohner H, Fisher K, Bentz M, Hansen K, Benner A, Cabot G, Diehl D, Schlenk R, Coy J, Stilgenbauer S, Volkmann M, Galle PR, Poustk A, Hunstein W, Lichter P. p53 gene deletion predicts for poor survival and non-response to therapy with purine analogs in chronic lymphocytic leukemias. *Blood* 1995; 85: 1580-89.

Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Krober A, Bullinger L, Dohner K, Bentz M, Lichter P. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000; 343: 1910-16.

Dyer MJ, Kelsey SM, Mackay HJ, Emmett E, Thornton P, Hale G, Waldmann H, Newland AC, Catovsky D. In vivo 'purging' of residual disease in CLL with Campath-1H. *Br J Haematol* 1997; 97: 669-72.

El Rouby S, Thomas A, Costin D, Rosenberg CR, Potmesil M, Silber R, Newcomb EW. p53 gene mutation in B-cell chronic lymphocytic leukemia is associated with drug resistance and is independent of MDR1/MDR3 gene expression. *Blood* 1993; 82: 3452-59.

Faderl S, Thomas DA, O'Brien S, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Giles FJ, Koller C, Ferrajoli A, Verstovsek S, Pro B, Andreeff M, Beran M, Cortes J, Wierda W, Tran N, Keating MJ. Experience with alemtuzumab plus rituximab in patients with relapsed and refractory lymphoid malignancies. *Blood* 2003; 101: 3413-15.

Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Llenos PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992; 148: 2207-16.

Fegan C, Robinson H, Thompson P, Whittaker JA, White D. Karyotypic evolution in CLL: identification of a new sub-group of patients with deletions of 11q and advanced or progressive disease. *Leukemia* 1995; 9: 2003-8.

Freedman AS. Immunobiology of chronic lymphocytic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am* 1990; 4: 405-29.

French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukaemia. Long-term results of the CHOP regimen in stage C chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1989; 73: 334-40.

French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukaemia. Natural history of stage A chronic lymphocytic leukaemia untreated patients. *Br J Haematol* 1990a; 76: 45-57.

French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. A randomized clinical trial of chlorambucil versus COP in stage B chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1990b; 75: 1422-25.

Gallego A, Vargas JA, Castejon R, Citores MJ, Romero Y, Millan I, Durantez A. Production of intracellular IL-2, TNF- α and IFN- γ by T cells in B-CLL. *Cytometry (Clinical Cytometry)* 2003; 56B: 23-29.

García Manero G, O'Brien S, Cortes J et al. Update of the results of the combination of fludarabine, cyclophosphamide and rituximab for previously treated patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) (abstract). *Blood* 2001; 98: 633a.

Garcia-Marco JA, Price CM, Ellis J, Morey M, Matutes E, Lens D, Colman S, Catovsky D. Correlation of trisomy 12 with proliferating cells by combined immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1996; 10: 1705-11.

Ghia P, Guida G, Stella S, Gottardi D, Geuna M, Stroia G, Scielzo C, Caligaris-Cappio F. The pattern of CD38 expression defines a distinct subset of chronic lymphocytic leukemia (CLL) patients at risk of disease progression. *Blood* 2003; 101: 1262-69.

Giles FJ, Bekele BN, O'Brien S, Cortes JE, Verstovsek S, Balerdi M, Yared M, Zhou X, Kantarjian HM, Keating MJ, Thall P, Albitar M. A prognostic model for survival in chronic lymphocytic leukaemia based on p53 expression. *Br J Haematol* 2003; 121: 578-85.

Giles FJ, O'Brien SM, Keating MJ. Chronic lymphocytic leukemia in (Richter's) transformation. *Semin Oncol* 1998; 25: 117-25.

Gobé GC, Axelsen RA, Searle JW. Cellular events in experimental unilateral ischemic renal atrophy and in regeneration after contralateral nephrectomy. *Lab Invest* 1990; 63: 770-79.

Gorczyca W, Bruno S, Darzynkiewicz RJ, Gong J, Darzynkiewicz Z. DNA strand breaks occurring during apoptosis: their early in situ detection by the terminal deoxynucleotidyl transferase and nick translation assays and prevention by serine protease inhibitors. *Int J Oncol* 1992; 1: 639-48.

Gottardi D, Alfarano A, De Leo AM, Stachini A, Aragno M, Rigo A, Veneri D, Zanotti R, Pizzolo G, Caligaris-Carpio F. In leukaemic CD5+ cells the expression of Bcl-2 gene family is shifted toward protection from apoptosis. *Br J Haematol* 1996; 94: 612-18.

Gottardi D, De Leo AM, Alfarano A, Stacchini P, Circosta P, Gregoret MG, Bergui L, Aragno M, Caligaris-Cappio F. Fludarabine ability to down-regulate Bcl-2 gene product in CD5+ leukaemic B cells: in vitro/in vivo correlations. *Br J Haematol* 1997; 99:147-57.

Hainsworth JD, Litchy S, Barton JH, Houston GA, Hermann RC, Bradof JE, Greco FA; Minnie Pearl Cancer Research Network. Single-agent rituximab as first-line and maintenance treatment for patients with chronic lymphocytic leukemia or small lymphocytic lymphoma: a phase II trial of the Minnie Pearl Cancer Research Network. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1746-51.

Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1848-54.

Hamblin TJ, Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, Thomas PW, Stevenson FK, Oscier DG. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 2002; 99: 1023-29.

Han T, Emrich LJ, Ozer H, Reese PA, Gajera R, Gomez GA, Henderson ES, Bloom ML, Bhargava A, Fitzpatrick J. Clinical significance of serum lactate dehydrogenase in chronic lymphocytic leukemia. *N Y State J Med* 1985; 85: 685-90.

Han T, Ezdinli EZ, Shimaoka K, Desai DV. Chlorambucil vs. combined chlorambucil-corticosteroid therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1973; 31: 502-8.

Hansen MM, Andersen E, Birgens H. CHOP versus Chlorambucil + Prednisone in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1991; 5: 97-102.

Hanson CA, Gribbin TE, Schnitzer B, Schlegelmilch JA, Mitchell BS, Stoolman LM. CD11c (LEU-M5) expression characterizes a B-cell chronic lymphoproliferative disorder with features of both chronic lymphocytic leukemia and hairy cell leukemia. *Blood* 1990; 76: 2360-67.

Hanson JA, Bentley DP, Bean EA, Nute SR, Moore JL. In vitro chemosensitivity testing in chronic lymphocytic leukaemia patients. *Leuk Res* 1991; 15:565-69.

Harmon BV, Corder AM, Collins RJ, Gobé GC, Allen J, Allan DJ, Ferr JF. Cell death induced in a murine mastocytoma by 42-47 degrees C heating in vitro: evidence that the

form of death changes from apoptosis to necrosis above a critical heat load. *Int J Rad Biol* 1990; 58: 845-58.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, Lister TA, Bloomfield CD. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. *J Clin Oncol* 1999; 17: 3835-49.

Hensel M, Kornacker M, Yammeni S, Egerer G, Ho AD. Disease activity and pretreatment, rather than hypogammaglobulinaemia, are major risk factors for infectious complications in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 122: 600-606.

Hernandez JA, Land KJ, McKenna RW. Leukemias, myeloma, and other lymphoreticular neoplasms. *Cancer* 1995; 75 (Suppl): 381-94.

Hilgenfeld E, Knauf WU, Thiel E. Cytotoxicity of flurarabine in vitro cannot predict clinical outcome in patients with advanced stage B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Leukemia* 1995; 9: 541-46.

Hisada M, Biggar RJ, Greene MH, Fraumeni JF Jr, Travis LB. Solid tumors after chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2001; 98: 1979- 81.

Ho AD, Thaler J, Stryckmans P, Coiffier B, Luciani M, Sonneveld P, Lechner K, Rodenhuis S, Peetermans ME, deCataldo F. Pentostatin in refractory chronic lymphocytic leukemia: a phase II trial of the European Organization for Research and Treatment of Cancer. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82:1416-20.

Huang JC, Finn WG, Goolsby CL, Variakojis D, Peterson LC. CD5- small B-cell leukemias are rarely classifiable as chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 1999; 111:123-30.

Huguley CM Jr. Treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Treat Rev* 1977; 4: 261-73.

Iannitto E, Ammatuna E, Marino C, Cirrincione S, Greco G, Mariani G. Sustained response of refractory chronic lymphocytic leukemia in progression complicated by acute hemolytic anemia to anti-CD20 monoclonal antibody. *Blood* 2002; 99: 1096-97.

International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Chronic lymphocytic leukemia: recommendations for diagnosis, staging, and response criteria. *Ann Intern Med* 1989; 110: 236-38.

Jaksic B, Brugiattelli M, Krc I, Losonczi H, Holowiecki J, Planinc-Peraica A, Kusec R, Morabito F, Iacopino P, Lutz D. High dose chlorambucil versus Binet's modified cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone regimen in the treatment of patients with advanced B-cell chronic lymphocytic leukemia. Results of an international multicenter randomized trial. *International Society for Chemo-Immunotherapy, Vienna. Cancer* 1997; 79: 2107-14.

Jaksic B, Brugiattelli M. High dose continuous chlorambucil vs intermittent chlorambucil plus prednisone for treatment of B-CLL--IGCI CLL-01 trial. *Nouv Rev Fr Hematol* 1988; 30: 437-42.

Johannsson J, Specht L, Mejer J, Jensen BA. Phase II study of palliative low-dose local radiotherapy in disseminated indolent non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002; 54: 1466-70.

Johnson S, Smith AG, Loffler H, Osby E, Juliusson G, Emmerich B, Wyld PJ, Hiddemann W. Multicentre prospective randomised trial of fludarabine versus cyclophosphamide, doxorubicin, and prednisone (CAP) for treatment of advanced-stage chronic lymphocytic leukaemia. The French Cooperative Group on CLL. *Lancet* 1996; 347: 1432-38.

Jondal M, Holm G, Wigzell H. Surface markers of human T and B lymphocytes. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *J Exp Med* 1972; 136: 207-15.

Juliusson C, Elmhorn-Rosemberg A, Liliemark J. Response to 2-chlorodeoxyadenosine in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia resistant to fludarabine. *N Engl J Med* 1992; 327: 1056-61.

Juliusson G, Gahrton G. Cytogenetics in CLL and related disorders. *Baillieres Clin Haematol* 1993; 6: 821-48.

Juliusson G, Oscier DG, Fitchett M, Ross FM, Stockdill G, Mackie MJ, Parker AC, Castoldi GL, Guneo A, Knuutila S, et al. Prognostic subgroups in B-cell chronic lymphocytic leukemia defined by specific chromosomal abnormalities. *N Engl J Med* 1990; 323: 720-24.

Kano Y, Akutsu M, Tsunoda S, Suzuki K, Ichikawa A, Furukawa Y, Bai L, Kon K. In vitro cytotoxic effects of fludarabine (2-F-ara-A) in combination with commonly used antileukemic agents by isobologram analysis. *Leukemia* 2000; 14:379-88.

Karlsson K, Stromberg M, Liliemark J, Delannoy A, Johnson SA, Porwit A, Kimby F, Larfars G, Christiansen I, Nilsson G, Celsing F, Sundstrom G, Luthman M, Tidefelt U, Wallvik J, Juliusson G. Oral cladribine for B cell chronic lymphocytic leukaemia: report of a phase II trial with a 3-d, 3-weekly schedule in untreated and pretreated patients, and a long term following-up of 126 previously untreated patients. *Br J Haematol* 2002; 116: 538-48.

Keating MJ, O'Brien S, Plunkett W, Robertson LE, Gandhi V, Estey E. Fludarabine phosphate: a new active agent in hematologic malignancies. *Semin Hematol* 1994; 31: 28-39.

Keating M, Lerner S, Kantarjian H, Freireich E, O'Brien S. The serum B2-microglobulin level is more powerful than stage in predicting response and survival in chronic lymphocytic leukemia (CLL) [abstract]. *Blood* 1995; 86:606a.

- Keating MJ, Flinn I, Jain V, Binet JL, Hillmen P, Byrd J, Albitar M, Brettman L, Santabarbara P, Wacker B, Rai KR. Therapeutic role of alemtuzumab (Campath-1H) in patients who have failed fludarabine: results of a large international study. *Blood* 2002; 99: 3554-61.
- Keating MJ, Hester JP, Mc Credu KB. Long term results of CAP therapys in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk lymphoma* 1990; 2: 391-4.
- Keating MJ, Kantarjian H, Talpaz M, Redman J, Koller C, Barlogie B, Velasquez W, Plunkett W, Freireich EJ, McCredie KB. Fludarabine: a new agent with major activity against chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1989; 74: 19-25.
- Keating MJ, Manshour T, O'Brien S. A high proportion of true complete remission can be obtained with a fludarabine, cyclophosphamide, rituximab combination (FCR) in chronic lymphocytic leukemia (abstract). *Proc. ASCO* 2003; 22: 569.
- Keating MJ, O'Brien S, Kantarjian H, Plunkett W, Estey E, Koller C, Beran M, Freireich EJ. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine as a single agent. *Blood* 1993; 81: 2878-84.
- Keating MJ, O'Brien S, Lerner S, Koller C, Beran M, Robertson LE, Freireich EJ, Estey E, Kantarjian H. Long-term follow-up of patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL) receiving fludarabine regimens as initial therapy. *Blood* 1998; 92: 1165-71.
- Keating MJ, Scouros M, Murphy S, Kantarjian H, Hester J, McCredie KB, Hersh EM, Freireich EJ. Multiple agent chemotherapy (POACH) in previously treated and untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1988; 2:157-64.
- Keller JW, Knospe WH, Raney M, Huguley CM Jr, Johnson L, Bartolucci AA, Omura GA. Treatment of chronic lymphocytic leukemia using chlorambucil and prednisone with or without cycle-active consolidation chemotherapy. A Southeastern Cancer Study Group Trial. *Cancer* 1986; 58: 1185-92.
- Kempin S, Lee BJ 3rd, Thaler HT, Koziner B, Hecht S, Gee T, Arlin Z, Little C, Straus D, Reich L, Phillips E, Al-Mondhiry H, Dowling M, Mayer K, Clarkson B. Combination chemotherapy of advanced chronic lymphocytic leukemia: the M-2 protocol (vincristine, BCNU, cyclophosphamide, melphalan, and prednisone). *Blood* 1982; 60: 1110-21.
- Kennedy B, Rawstron A, Carter C, Ryan M, Speed K, Lucas G, Hillmen P. Campath-1H and fludarabine in combination are highly active in refractory chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 99: 2245-47.
- Kern DH, Weisenthal LM. Highly specific prediction of antineoplastic drug resistance with an in vitro assay using suprapharmacologic drug exposures. *J Natl Cancer Inst* 1990; 82: 582-88.
- Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-57.

- Khouri IF, Keating MJ, Vriesendorp HM, Reading CL, Przepiorka D, Huh YO, Andersson BS, van Besien KW, Mehra RC, Giralt SA. Autologous and allogeneic bone marrow transplantation for chronic lymphocytic leukemia: preliminary results. *J Clin Oncol* 1994; 12: 748-58.
- Khouri IF, Przepiorka D, van Besien K, O'Brien S, Palmer JL, Lerner S, Mehra RC, Vriesendorp HM, Andersson BS, Giralt S, Korbling M, Keating MJ, Champlin RE. Allogeneic blood or marrow transplantation for chronic lymphocytic leukaemia: timing of transplantation and potential effect of fludarabine on acute graft-versus-host disease. *Br J Haematol* 1997; 97: 466-73.
- Kimby E, Mellstedt H. Chlorambucil/Prednisone versus CHOP in symptomatic chronic lymphocytic leukemia of B-cell type. A randomized trial. *Leuk Lymphoma* 1991; 5: 93-8.
- Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia and related diseases. En Beutler E, Collier BS, Lichtman MA, Kipps TJ, Seligsohn U Eds, *Hematology*. McGraw-Hill 2002, pages 1350-63.
- Kjeldsberg CR, Marty J. Prolymphocytic transformation of chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1981; 48: 2447-57.
- Koopman G, Rentelingspergen CPM, Kuijten GAM, Kechen RMJ, Pals ST, Van Oers MHJ. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression of B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994; 84: 1415-20.
- Krober A, Seiler T, Benner A, Bullinger L, Bruckle E, Lichter P, Dohner H, Stilgenbauer S. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 1410-16.
- Kurec AS, Threatte GA, Gottlieb AJ, Smith JR, Anderson J, Davey FR. Immunophenotypic subclassification of chronic lymphocytic leukaemia (CLL). *Br J Haematol* 1992; 81: 45-51.
- Laurencet FM, Zulian GB, Guetty-Alberto M, Iten PA, Betticher DC, Alberto P. Cladribine with cyclophosphamide and prednisone in the management of low-grade lymphoproliferative malignancies. *Br J Cancer* 1999; 79: 1215-19.
- Leporrier M, Chevret S, Cazin B, Boudjerra N, Feugier P, Desablens B, Rapp MJ, Jaubert J, Autrand C, Divine M, Dreyfus B, Maloum K, Travade P, Dighiero G, Binet JL, Chastang C; French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* 2001; 98: 2319-25.
- Liepmann M, Votaw ML. The treatment of chronic lymphocytic leukemia with COP chemotherapy. *Cancer* 1978; 41: 1664-69.
- Liliemark J, Juliusson G. On the pharmacokinetics of the 2-chloro-2'-deoxyadenosine in humans. *Cancer Res* 1991; 51: 5570-72.

Lin K, Sherrington PD, Dennis M, Matrai Z, Cawley JC, Pettitt AR. Relationship between p53 dysfunction, CD38 expression, and IgV(H) mutation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100: 1404-49.

Liu Y-J, Joshua DE, Williams GT, Smith CA, Gordon J et al. Mechanism of antigen-driven selection in germinal centers. *Nature* 1989; 342: 929-931.

Mason JM, Drummond MF, Bosanquet AG, Sheldon TA. The DiSC assay: a cost-effective guide to treatment for chronic lymphocytic leukaemia? *International Journal of Technology Assessment in Health Care* 1999; 15: 173-84.

Mauro FR, Foa R, Giannarelli D, Cordone I, Crescenzi S, Pescarmona E, Sala R, Cerretti R, Mandelli F. Clinical characteristics and outcome of young chronic lymphocytic leukemia patients: a single institution study of 204 cases. *Blood* 1999; 94: 448-54.

Michallet M, Archimbaud E, Bandini G, Rowlings PA, Deeg HJ, Gahrton G, Montserrat E, Rozman C, Gratwohl A, Gale RP. HLA-identical sibling bone marrow transplantation in younger patients with chronic lymphocytic leukemia. European Group for Blood and Marrow Transplantation and the International Bone Marrow Transplant Registry. *Ann Intern Med* 1996; 124: 311-15.

Michallet M, Corront B, Hollard D, Gratwohl A, Milpied N, Dauriac C, Brunet S, Soler J, Jouet JP, Esperou Bourdeau H. Allogeneic bone marrow transplantation in chronic lymphocytic leukemia: 17 cases. Report from the EBMTG. *Bone Marrow Transplant* 1991; 7: 275-79.

Michallet M, Thiebaut A, Dreger P, Remes K, Milpied N, Santini G, Hamon M, Bjorkstrand B, Kimby E, Belhabri A, Tanguy ML, Apperley JF. Peripheral blood stem cell (PBSC) mobilization and transplantation after fludarabine therapy in chronic lymphocytic leukemia (CLL): a report of the European Blood and Marrow Transplantation (EBMT) CLL subcommittee on behalf of the EBMT Chronic Leukaemias Working Party (CLWP). *Br J Haematol* 2000; 108: 595-601.

Molica S, Alberti A. Prognostic value of the lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 1987; 60: 2712-16.

Molica S, Levato D, Cascavilla N, Levato L, Musto P. Clinico-prognostic implications of simultaneous increased serum levels of soluble CD23 and beta2-microglobulin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol* 1999; 62: 117-22.

Montserrat E, Gomis F, Vallespi T, Rios A, Romero A, Soler J, Alcala A, Morey M, Ferran C, Diaz-Mediavilla J. Presenting features and prognosis of chronic lymphocytic leukemia in younger adults. *Blood* 1991; 78: 1545-51.

Montserrat E, Rozman C. Chronic lymphocytic leukaemia: prognostic factors and natural history. *Baillieres Clin Haematol* 1993; 6: 849-66.

Montserrat E, Sanchez-Bisoso J, Vinolas N, Rozman C. Lymphocyte doubling time in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of its prognostic significance. *Br J Haematol* 1986; 62: 567-75.

Montserrat E. Developing risk-adapted treatment strategies for chronic lymphocytic leukemia. En Cheson BD Ed, *Chronic lymphoid leukemias*. Marcel Dekker Inc, 2001, pags 377-91.

Montserrat E. Leucemia linfática crónica: clínica, pronóstico y terapia. En: *Leucemia linfática crónica B*. Enciclopedia de Salamanca (Eds): López-Borrascas A, Arocha Piñango CL, Campos Guerra CC, Pariera A, Paoulosky S, Ruiz-Argüelles G, San Miguel JF. 1992 pág II 304-309.

Morabito F, Callea I, Console G, Stelitano C, Sculli G, Filangeri M, Oliva B, Musolino C, Iacopino P, Brugiatelli M. The in vitro cytotoxic effect of mitoxantrone in combination with fludarabine or pentostatin in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 1997a; 82: 560-65.

Morabito F, Filangeri M, Callea I, Sculli G, Callea V, Fracchiolla NS, Neri A, Brugiatelli M. BCL-2 protein expression and p53 gene mutation in chronic lymphocytic leukemia: correlation with in vitro sensitivity to chlorambucil and purine analogs. *Haematologica* 1997b; 82: 16-20.

Morabito F, Stelitano C, Callea I, Dattola A, Console G, Puci G, Iacopino P, Callea V, di Raimondo F, Brugiatelli M. In vitro drug-induced cytotoxicity predicts clinical response to fludarabine in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Br J Haematol* 1998; 102: 528-31.

Morabito F, Stelitano C, Callea I, Filangeri M, Oliva B, Sculli G, Callea V, Nobile F, Brugiatelli M. In vitro sensitivity of chronic lymphocytic leukemia B-cells to fludarabine, 2-chlorodeoxyadenosine and chlorambucil: correlation with clinico-hematological and immunophenotypic features. *Haematologica* 1996; 81:224-31.

Moreno A, Villar ML, Cámara C, Luque R, Cespón C, González-Porqué P, Roy G, López-Jiménez J, Bootello A, Roldán E. Interleukin-6 dimers produced by endothelial cells inhibit apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2001; 97: 242-49.

Morrison VA. The infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 1998, 25: 98-106.

Morrison VA, Rai KR, Peterson BL, Kolitz JE, Elias L, Appelbaum FR, Hines JD, Shepherd L, Martell RE, Larson RA, Schiffer CA. Impact of therapy With chlorambucil, fludarabine, or fludarabine plus chlorambucil on infections in patients with chronic lymphocytic leukemia: Intergroup Study Cancer and Leukemia Group B 9011. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3611-21.

Morrison VA, Rai KR, Peterson BL, Kolitz JE, Elias L, Appelbaum FR, Hines JD, Shepherd L, Larson RA, Schiffer CA. Therapy-related myeloid leukemias are observed in patients with chronic lymphocytic leukemia after treatment with fludarabine and

chlorambucil: results of an intergroup study, cancer and leukemia group B 9011. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3878-84.

Myint H, Copplestone JA, Orchard J, Craig V, Curtis D, Prentice AG, Hamon MD, Oscier DG, Hamblin TJ. Fludarabine-related autoimmune haemolytic anaemia in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1995; 91: 341-44.

Naylor M, Capra JD. Mutational status of Ig V(H) genes provides clinically valuable information in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999; 94: 1837-79.

Neal TF Jr, Tefferi A, Witzig TE, Su J, Phylipy RL, Nagorney DM. Splenectomy in advanced chronic lymphocytic leukemia: a single institution experience with 50 patients. *Am J Med* 1992; 93: 435-40.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Meth* 1991; 139: 271-79.

O'Brien S, Kantarjian H, Beran M, Smith T, Koller C, Estey E, Robertson LE, Lerner S, Keating M. Results of fludarabine and prednisone therapy in 264 patients with chronic lymphocytic leukemia with multivariate analysis-derived prognostic model for response to treatment. *Blood* 1993; 82: 1695-700.

O'Brien S, Kantarjian H, Estey E, Koller C, Robertson B, Beran M, Andreeff M, Pierce S, Keating M. Lack of effect of 2-chlorodeoxyadenosine therapy in patients with chronic lymphocytic leukemia refractory to fludarabine therapy. *N Engl J Med* 1994; 330: 319-22.

O'Brien SM, Kantarjian H, Cortes J, Beran M, Koller CA, Giles FJ, Lerner S, Keating M. Results of the fludarabine and cyclophosphamide combination regimen in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2001b; 19:1414-20.

O'Brien SM, Kantarjian H, Thomas DA, Giles FJ, Freireich EJ, Cortes J, Lerner S, Keating MJ. Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2001a; 19: 2165-70.

Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, Glide S, Davis ZA, Ibbotson RE, Corcoran MM, Chapman RM, Thomas PW, Copplestone JA, Orchard JA, Hamblin TJ. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002; 100: 1177-84.

Pettitt AR. Mechanism of action of purine analogues in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2003; 121: 692-702.

Plater-Zyberk C, Maini RN, Lam K, Kennedy TD, Janossy G. A rheumatoid arthritis B cell subset expresses a phenotype similar to that in chronic lymphocytic leukemia. *Arthritis Rheum* 1985; 28: 971-76.

Plosker GL, Figgitt DP. Oral fludarabine. *Drugs* 2003; 63: 2317-23.

- Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, Kamada N, Dohy H, Matsuo T, Matsui T. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res* 1994; 137: S68-97.
- Rabinowe SN, Soiffer RJ, Gribben JG, Daley H, Freedman AS, Daley J, Pesek K, Neuberg D, Pinkus G, Leavitt PR, et al. Autologous and allogeneic bone marrow transplantation for poor prognosis patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1993; 82: 1366-76.
- Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* 1992; 356: 397-401.
- Rai KR. A critical analysis of staging in CLL. In Gale RP, Rai KR (eds): *Chronic lymphocytic leukaemia: Recent progress and future directions*. UCLA Symposia on molecular and cellular biology, New series. Alan R. Liss, NY 1987; 59: 253-9.
- Rai KR, Freter CE, Mercier RJ, Cooper MR, Mitchell BS, Stadtmauer EA, Santabarbara P, Wacker B, Brettman L. Alemtuzumab in previously treated chronic lymphocytic leukemia patients who also had received fludarabine. *J Clin Oncol* 2002; 20: 3891-97.
- Rai KR, Patel DV. Chronic Lymphocytic leukemia. En Hoffman R, Benz EJ Jr, Shattil SJ, Furie B Cohen HJ Eds, *Hematology. Basic principles and practice*. Churchill Livingston, 2000, pags1350-63.
- Rai KR, Peterson BL, Appelbaum FR, Kolitz J, Elias L, Shepherd L, Hines J, Threatte GA, Larson RA, Cheson BD, Schiffer CA. Fludarabine compared with chlorambucil as primary therapy for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000b; 343: 1750-57.
- Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975; 46: 219-34.
- Raphael B, Andersen JW, Silber R, Oken M, Moore D, Bennett J, Bonner H, Hahn R, Knospe WH, Mazza J. Comparison of chlorambucil and prednisone versus cyclophosphamide, vincristine, and prednisone as initial treatment for chronic lymphocytic leukemia: long-term follow-up of an Eastern Cooperative Oncology Group randomized clinical trial. *J Clin Oncol* 1991; 9: 770-76.
- Rawstron AC, Green MJ, Kuzmicki A, Kennedy B, Fenton JA, Evans PA, O'Connor SJ, Richards SJ, Morgan GJ, Jack AS, Hillmen P. Monoclonal B lymphocytes with the characteristics of "indolent" chronic lymphocytic leukemia are present in 3.5% of adults with normal blood counts. *Blood* 2002; 100: 635-39.
- Ritgen M, Lange A, Stilgenbauer S, Dohner H, Bretscher C, Bosse H, Stühr A, Kneba M, Dreger P. Unmutated immunoglobulin variable heavy-chain gene status remains an adverse prognostic factor after autologous stem cell transplantation for chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2003; 101:2049-53.
- Robak T, Blonski JZ, Kasznicki M, Konopka L, Ceglarek B, Dmoszynska A, Soroka-Wojtaszko M, Skotnicki AB, Nowak W, Dwilewicz-Trojaczek J, Tomaszewska A, Hellmann A, Lewandowski K, Kuliczowski K, Potoczek S, Zdziarska B, Hansz J, Kroll R, Komarnicki M, Holowiecki J, Grieb P. Cladribine with or without prednisone

in the treatment of previously treated and untreated B-cell chronic lymphocytic leukaemia - updated results of the multicentre study of 378 patients. *Br J Haematol* 2000;108: 357-68.

Robertson LE, Huh YO, Butler JJ, Pugh WC, Hirsch-Ginsberg C, Stass S, Kantarjian H, Keating MJ. Response assessment in chronic lymphocytic leukemia after fludarabine plus prednisone: clinical, pathologic, immunophenotypic, and molecular analysis. *Blood* 1992; 80: 29-36.

Rozman C, Hernandez-Nieto L, Montserrat E, Bragues R. Prognostic significance of bone-marrow patterns in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 1981; 47: 529-37.

Rozman C, Montserrat E, Feliu E, Granena A, Marin P, Nomdedeu B, Vives Corrons JL. Prognosis of chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 150 cases. *Blood* 1982; 59: 1001-5.

Rozman C, Montserrat E, Rodriguez-Fernandez JM, Ayats R, Vallespi T, Parody R, Rios A, Prados D, Morey M, Gomis F. Bone marrow histologic pattern--the best single prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia: a multivariate survival analysis of 329 cases. *Blood* 1984; 64: 642-48.

Rozman C, Montserrat E. Chronic lymphocytic leukemia. *New Engl J Med* 1995; 333: 1052-57.

Salmon SE, Hamburger AW, Soehnlen B, Durie BGM, Alberts DS, Moon TE. Quantitation of differential sensitivity of human-tumor stem cells to anticancer drugs. *N Engl J Med* 1978; 298: 1321-27.

Saven A, Carrera CJ, Carson DA. 2-Chlorodeoxyadenosine treatment of refractory chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 1991; 5: 133-8.

Saven A, Lemon RH, Kosty M, Beutler E, Piro LD. 2-Chlorodeoxyadenosine activity in patients with untreated chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1995; 13: 570-74.

Saven A, Piro LD. 2-Chlorodeoxyadenosine: a newer purine analog active in the treatment of indolent lymphoid malignancies. *Ann Intern Med* 1994; 120: 784-91.

Sawitsky A, Rai KR, Glidewell O, Silver RT. Comparison of daily versus intermittent chlorambucil and prednisone therapy in the treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1977; 50: 1049-59.

Schetelig J, Thiede C, Bornhauser M, Schwerdtfeger R, Kiehl M, Beyer J, Sayer HG, Kroger N, Hensel M, Scheffold C, Held TK, Hoffken K, Ho AD, Kienast J, Neubauer A, Zander AR, Fauser AA, Ehninger G, Siegert W; Cooperative German Transplant Study Group. Evidence of a graft-versus-leukemia effect in chronic lymphocytic leukemia after reduced-intensity conditioning and allogeneic stem-cell transplantation: the Cooperative German Transplant Study Group. *J Clin Oncol* 2003; 21: 2747-53.

Schulz H, Klein SK, Rehwald U, Reiser M, Hinke A, Knauf WU, Aulitzky WE, Hensel M, Herold M, Huhn D, Hallek M, Diehl V, Engert A; German CLL Study Group. Phase 2 study of a combined immunochemotherapy using rituximab and fludarabine in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002; 100:3115-20.

Seymour JF, Cusack JD, Lerner SA, Pollock RE, Keating MJ. Case/control study of the role of splenectomy in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 1997; 15: 52-60.

Seymour JF, Robertson LE, O'Brien S, Lerner S, Keating MJ. Survival of young patients with chronic lymphocytic leukemia failing fludarabine therapy: a basis for the use of myeloablative therapies. *Leuk Lymphoma* 1995; 18: 493-96.

Shanafelt TD, Geyer SM, Kay NE. Prognosis at diagnosis: integrating molecular biologic insights into clinical practice for patients with CLL. *Blood* 2004; 103: 1202-10.

Shustik C, Mick R, Silver R, Sawitsky A, Rai K, Shapiro L. Treatment of early chronic lymphocytic leukemia: intermittent chlorambucil versus observation. *Hematol Oncol* 1988; 6: 7-12.

Silber R, Degar B, Costin D, Newcomb EW, Mani M, Rosenberg CR, Morse L, Drydas JC, Canellakis ZN, Dotmesil M. Chemosensitivity of lymphocytes from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia to chlorambucil, fludarabine and captothecin analogs. *Blood* 1994; 84: 3440-46.

Simonsson B, Wibell L, Nilsson K. Beta 2-microglobulin in chronic lymphocytic leukemia. *Scand J Haematol* 1980; 24: 174-180.

Sorensen JM, Vena DA, Fallavollita A, Chun HG, Cheson BD. Treatment of refractory chronic lymphocytic leukemia with fludarabine phosphate via the group C protocol mechanism of the National Cancer Institute: five-year follow up report. *J Clin Oncol* 1997; 15: 458-65.

Spati B, Child J, Kerruish S, Cooper E. Behaviour of serum beta 2-microglobulin and acute phase reactant proteins in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Haematol* 1980; 64: 79-86.

Sturm I, Bosanquet AG, Hermann S, Güner D, Dörken B, Daniel PT. Mutatiuon of p53 and consecutive selective drug resistance in B-CLL occurs as a consequence of prior DNA-damaging chemotherapy. *Cell death and Differentiation* 2003; 10: 477-84.

Tartaglia LA, Ayres TM, Wrong GHW, Goeddel DV. A novel domain within the 55 Kd TNF receptors signals cell death. *Cell* 1993; 74: 845-53.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Nature* 1995; 267: 1456-62.

Thornton PD, Hamblin M, Treleaven JG, Matutes E, Lakhani AK, Catovsky D. High dose methyl prednisolone in refractory chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Lymphoma* 1999; 34: 167-70.

Travis LB, Curtis RE, Hankey BF, Fraumeni JF Jr. Second cancers in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84: 1422-27.

Trentin L, Zambello R, Agostini C, Enthammer C, Adami F, Zamboni S, Semenzato G. Expression and regulation of tumor necrosis factor, interleukin-2 and hematopoietic growth factor receptors in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1994; 84: 4249-56.

Tsiodras S, Samonis G, Keating MJ, Kontoyiannis DP. Infection and immunity in chronic lymphocytic leukemia. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 1039-54.

Vallespi T, Montserrat E, Sanz MA. Chronic lymphocytic leukaemia: prognostic value of lymphocyte morphological subtypes. A multivariate survival analysis in 146 patients. *Br J Haematol* 1991; 77: 478-85.

Vaquero M. Apoptosis: ser o no ser, ésa es la cuestión. *Med Clin (Barc)* 2000; 114: 144-56.

Weed RI. Exaggerated delayed hypersensitivity to mosquito bites in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1965; 26: 257-68.

Weisenthal LM, Lippman ME. Clonogenic and nonclonogenic in vitro chemosensitivity assays. *Cancer Treat Rep* 1985; 69:315-32.

Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, Wright G, Davis RE, Henrickson SE, Zhao H, Ibbotson RE, Orchard JA, Davis Z, Stetler-Stevenson M, Raffeld M, Arthur DC, Marti GE, Wilson WH, Hamblin TJ, Oscier DG, Staudt LM. Zap-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003; 101:4944-51.

Wijsman JH, Jonker RR, Keijzer R, Van der Velde CJH, Corneliss CJ, Van Dierendonek JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: In situ end-labelling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem* 1993; 41: 7-12.

Winkler U, Jensen M, Manzke O, Schulz H, Diehl V, Engert A. Cytokine-release syndrome in patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia and high lymphocyte counts after treatment with an anti-CD20 monoclonal antibody (rituximab, IDEC-C2B8). *Blood* 1999; 94: 2217-24.

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1992; 68: 251-305.

Wyllie AH. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogeneous nuclease activation. *Nature* 1980; 284: 555-59.

Yang H, Rosove MH, Figlin RA. Tumor lysis syndrome occurring after the administration of rituximab in lymphoproliferative disorders: high-grade non-Hodgkin's lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Am J Hematol* 1999; 62: 247-50.

Yuille MR, Matutes E, Marossy A, Hilditch B, Catovsky D, Houlston RS. Familial chronic lymphocytic leukaemia: a survey and review of published studies. *Br J Haematol* 2000; 109: 794-99.

Zamai L, Falcieri E, Zaulli G, Cataldi A, Vitale M. Optimal detection of apoptosis by flow cytometry depends on cell morphology. *Cytometry* 1993; 14: 891-97.

Zinzani PL, Tosi P, Visan G, Martinelli G, Farabegoli P, Buzzi M, Ottaviani E, Salvucci M, Bendandi M, Sacaria A, Ture S. Apoptosis induction with three nucleoside analogs on freshly isolated B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Am J Hematol* 1994; 47: 301-6.

